Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. J. Heidrich

und

Aus der Lehr- und Versuchsstation der Arbeitsgemeinschaft
Schleswig-Holsteinischer Rinderbesamungsvereinigungen E. V.,
Schönböken

Tierärztliche Leitung: Dr. N. Mäckle

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DER SPERMAVERDÜNNER SPERMASOL-N UND MAGERMILCH-GLYCERIN ZUR KONSERVIERUNG VON BULLENSAMEN BEI KÜHLSCHRANKTEMPERATUR

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johannes W. W. Tillack
Tierarzt aus Crossen/Oder

Berlin 1961
Journal Nr. 354

Druck: KLEINOFFSET - DRUCKEREI
CHARLOTTE SCHMIDT o.H.G.

BERLIN-CHARLOTTENBURG
DAHLMANNSTRASSE 15
TELEFON: 97 48 15

Aus der Klinik für Tiergeburtshilfe und Klauentierkrankheiten
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. J. Heidrich

und

Aus der Lehr- und Versuchsstation der Arbeitsgemeinschaft
Schleswig-Holsteinischer Rinderbesamungsvereinigungen E. V.,
Schönböken

Tierärztliche Leitung: Dr. N. Mäckle

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DER SPERMAVERDÜNNER SPERMASOL-N UND MAGERMILCH-GLYCERIN ZUR KONSERVIERUNG VON BULLENSAMEN BEI KÜHLSCHRANKTEMPERATUR

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Johannes W. W. Tillack
Tierarzt aus Crossen/Oder

Berlin 1961
Journal Nr. 354

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. L. F. Müller
Referent:	Prof. Dr. H. J. Heidrich
Korreferent:	Prof. Dr. K. Bronsch

Tag der Promotion: 14. Dezember 1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsübersicht

	Seite:
A. Einleitung	1
B. Schrifttum	6
1. Historischer Überblick	6
2. Salinische Samenverdünnungsverfahren	7
a. Spermasol als Grundlage für Samenverdünner	9
3. Milch als Grundlage für Samenverdünner	13
a. In-vitro-Versuche	14
b. Besamungsversuche	15
b 1. Abgekochte Milch ohne fremde Zusätze als Samenverdünner für Wiederkäuer- und Hengstsperma	15
b 2. Milchverdünner in der Rinderbesamung unter Hinzufügung verschiedener Zusätze	16
b 3. Glycerin als Zusatz zum Milchverdünner	20
b 4. Zubereitung des Milch-Glycerin-Verdünners nach ALMQUIST (1959)	25
C. Eigene Untersuchungen	26
I. Allgemeines zur Versuchsanordnung	26
II. Vorversuche zu den einzelnen Verdünnerbestandteilen und zum Verdünnungsmodus	27
1. Milch als Verdünnerbestandteil	27
2. Wasser als Verdünnerbestandteil	27
3. Erhöhung der Viskosität des Magermilch-Glycerin-Verdünners durch Einbau von von Gelatine	34
4. Glycerin als Verdünnerzusatz	35
5. Herstellung des Magermilch-Glycerin-Verdünners	44
6. Verdünnungsmodus	45
7. Konservierungsergebnisse nach Verdünnung mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin	50
III. Ergebnisse der Besamungsversuche	55
1. Gesamtbefruchtungsergebnis	55
2. Befruchtungsergebnisse von 39 Bullen	59

Seite:

3. Verdünnungsgrad und Befruchtungsergebnisse 70

4. Konservierungsdauer und Befruchtungsergebnisse 81

D. Zusammenfassende Besprechung der Versuchsergebnisse 89

E. Zusammenfassung 97

F. Literaturquellen 100

A. Einleitung

Die Samenübertragung hat seit dem Beginn ihrer Anwendung in der Praxis durch MILOWANOV (1930) eine überaus schnelle Entwicklung durchlaufen, die sich in den Jahren nach dem letzten Kriege noch verstärkt hat. Während im Jahre 1951 auf der ganzen Erde nur 20 bis 30 Mill. Kühe besamt wurden, das entspricht 3 bis 4 % des Weltbestandes von 720 Mill. Kühen (BONADONNA, 1951), waren es nach Angabe desselben Autors im Jahre 1957 schon 35 Mill. Kühe, d.h. ungefähr 5 % des Weltbestandes an deckfähigen Kühen (BONNADONNA, 1957).

Eines der wichtigsten technischen Probleme der Samenübertragung ist die Lebenderhaltung des Samens außerhalb des Organismus (GÖTZE, 1949). Als Vorbild für alle Versuche und Maßnahmen, die zur Erhaltung des Lebens der Spermien in vitro unternommen werden, müssen die Vorgänge im Samenspeicher des Nebenhodens dienen. Hier findet nach GÖTZE (1949) die biologisch vollkommene Samenaufbewahrung über sehr lange Zeiträume statt.

Zur vollen Ausnutzung der Möglichkeiten, die durch die Anwendung der Samenübertragung geboten werden, ist die Erfüllung von zwei grundlegenden Voraussetzungen, die an eine geeignete Spermakonservierung in vitro zu stellen sind, notwendig:

1. Anhalten der vollen Befruchtungsfähigkeit des konservierten Spermas über möglichst lange Zeiträume.
2. Ökonomische Nutzung der Ejakulate durch hohe Verdünnung derselben, ohne daß die Lebens- und Befruchtungskraft der Spermien beeinträchtigt wird.

Konservierungsverfahren, die diesen Ansprüchen genügen, sind geeignet, die Anforderungen der Praxis zu erfüllen. Als wichtigste Belange der Praxis gelten in diesem Zusammenhang die Ermöglichung der freien Bullenwahl und die Gewährleistung der Einhaltung genügend langer Zeitintervalle zwischen den erforderlich werdenden Samenentnahmen.

Die Verdünnerforschung ist somit zu einer der wichtigsten Themen der Grundlagenforschung der Besamung geworden (AEHNELT, 1951). Je größer die Fortschritte auf diesem Gebiet sind, um so erfolgreicher wird die Samenübertragung sein können. Der Weg zu Fortschritten führt über die Notwendigkeit, Samenkonservierungsmittel zu entwickeln, die zunächst einmal in der Lage sind, den verdünnten Samen über die Zeitspanne, die zwischen zwei Ejakulatsentnahmen liegen muß, voll lebens- und befruchtungsfähig zu erhalten. Dadurch könnte der Forderung nach der freien Bullenwahl, die von der Tierzucht durchaus mit Berechtigung gestellt wird, nachgekommen werden, indem jederzeit über Samendosen aller im Einsatz befindlichen Vatertiere verfügt werden könnte.

Die von verschiedenen Autoren geforderten unterschiedlich langen Intervalle zwischen den Samenentnahmen von den Bullen dürften in erster Linie auf rassen- und bioklimatischbedingten Unterschieden der Sexualpotenz der Vatertiere der untersuchten Rinderrassen beruhen.

AEHNELT (1951) will den Zeitraum zwischen zwei Entsamungen eines Bullen möglichst auf 8 Tage ausgedehnt wissen. Durch diese weitgehende Schonung der Bullen soll die gleichbleibende Qualität der Ejakulate und ihre permanent unverminderte Befruchtungskraft gewährleistet sein. Neben dieser Auffassung steht aber der Hinweis von BONADONNA (1956), daß es am zweckmäßigsten erscheint, wöchentlich

zwei Ejakulationen zu verlangen. Eine längere Ruhepause bewirke oft einen Rückgang in der Sexualaktivität der Bullen, der meist nur langsam wieder aufzuholen sei. EIBL (1959) hingegen hält einen Entsamungsabstand für die Bullen von 4 bis 5 Tagen für optimal.

Die zur Konservierung erforderliche Verdünnungsflüssigkeit muß, wie bereits erwähnt, diesen Ansprüchen gerecht werden können. Zur Erreichung dieser Ziele sind in den letzten Jahren erfolgversprechende Versuche unternommen worden. Im Vordergrund der Diskussion stehen folgende neue Konservierungsverfahren:

1. Inaktivierung des Samens durch CO_2
2. Samenkonservierung durch Tiefkühlung
3. Samenkonservierung durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)

In der Praxis erprobt sind von den angeführten Methoden bisher die CO_2-Inaktivierung und die Spermatiefkühlung. Die Sperma-Gefriertrocknung hat das Stadium der experimentellen Forschung noch nicht überschritten. Die Konservierung des Spermas durch CO_2-Inaktivierung und Tiefkühlung gewährleisten zwar die Einhaltung der optimalen Entsamungsintervalle und damit auch die freie Bullenwahl, erfordern jedoch einen großen technischen und kostspieligen Aufwand, der in kleinen Besamungsstationen nicht gegeben ist. Die Spermatiefkühlung ist zudem noch mit dem Nachteil einer nicht zu unterschätzenden Einbuße der Befruchtungskraft des tiefgefrorenen Spermas belastet.

In diesen Tatsachen liegen die Gründe dafür, daß in der Bundesrepublik auch heute noch vorwiegend neben verschiedenen Zitrat-Verdünnern die Fertigverdünner Spermasol-S und Spermasol-N der Firma MACK, Illertissen, verwendet werden. Mit den beiden Spermasol-Verdünnern

können unter Berücksichtigung der von der Herstellungsfirma angewiesenen Richtlinien für den Verdünnungsmodus und Verdünnungsgrad zum Teil gute Erfolge erzielt werden (AEHNELT, 1951, HOELZER, 1951, GÖTZE, AEHNELT und RATH, 1953, BONFERT, 1953, BAIER und Mitarbeiter 1955, A. BONFERT, M. BONFERT und REUSS, 1955).

Das Spermasol-N erweist sich jedoch bei höheren Verdünnungsgraden und bei einer über drei Tage hinausgehenden Nutzung des Samens als ein Konservierungsmittel, das den Erfordernissen der Praxis nicht voll gerecht wird. Andere, reine Natrium-Zitrat-Verdünner erlauben zwar ein höheres Verdünnungsverhältnis, ermöglichen aber auch nicht eine längere Konservierungsdauer.

Von zahlreichen Autoren wird neuerdings der Kuhmilch als biologischer Samenpuffer mehr und mehr der Vorzug gegeben. Durch Zusätze wird versucht, optimale Konservierungsbedingungen zu erzielen.

Auf Anregung von Herrn Dr. MÄCKLE wurde mir von Herrn Prof. Dr. HEIDRICH die Aufgabe gestellt, den von ALMQUIST (1959) vorgeschlagenen Magermilch-Glycerin-Verdünner, mit dem unter anderem auch LA GRANGE (1959) in Süd-Afrika unter schwierigsten Praxisverhältnissen gute Erfolge erzielt hat, im Bereich der Zentralbesamungsstation Schönböken vergleichend mit Spermasol-N zu prüfen.

Die Untersuchungen sollten der Beantwortung folgender Fragen dienen:

1. Können mit der Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners bessere Konservierungs- und Besamungsergebnisse erzielt werden, als mit Spermasol-N?

2. Welches Verdünnungsverhältnis erlaubt der Magermilch-Glycerin-Verdünner?

3. Schafft die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners Voraussetzungen, die der Einhaltung des optimalen Entsamungsintervalles und der Erreichung des Zieles der Gewährleistung der freien Bullenwahl entgegenkommen?

B. Schrifttum

Im folgenden Abschnitt soll unter Anführung der wichtigsten Literaturhinweise neben einem kurzen historischen Überblick und unter Berücksichtigung der bekannten salinischen Samenverdünner die Möglichkeit erläutert werden, Milch als Samenkonservierungsflüssigkeit für Wiederkäuer- und Hengstsperma anzuwenden.

Weiterhin werden Beispiele für die Kombination der Milch mit verschiedenen Zusatzstoffen angeführt.

1. Historischer Überblick.

Die ersten bekannten Versuche, die Milch als Verdünnungsmittel für Samen zu verwenden, erfolgten nach HOFFMANN (1905) schon im Jahre 1786. Mit der Vervollkommnung der mikroskopischen Technik durch LEEUWENHOEK (1632 - 1723) wurde es möglich, physiologische Untersuchungen am tierischen und menschlichen Organismus durchzuführen. Um das Jahr 1698 sah der Holländer HAM (1651? - 1730?) im Ejakulat des Mannes erstmalig "Samentierchen", ohne aber die Bedeutung seiner Entdeckung zu erkennen. Die Rolle der "Samentierchen" wurde auch in den folgenden Jahren in unterschiedlicher Deutung als unerheblich für den Befruchtungsvorgang abgetan. Die Zoologen jener Zeit, wie MÜLLER (1773) und PALLAS stellten die Spermien z.B. in die Gruppe der Infusionstierchen und Cerkarien.
Auch die Untersuchungen von DONNÉ aus dem Jahre 1837 fallen noch in die Zeit vor der Entdeckung KÖLLIKERS (1841), daß die Spermien Zellen sind. DONNÉ prüfte die Wirkung verschiedener vom Tier stammender Flüssigkeiten, wie Urin, Speichel und Milch auf die Bewegung der menschlichen Samenfäden (Zit. nach JOEL, 1953).

Exakte Versuche, ein geeignetes Konservierungsmittel für Samen zu finden, begannen naturgemäß erst mit der praktischen Einführung der Samenübertragung durch MILOWANOW im Jahre 1930.

Allen bis heute erprobten Samenkonservierungsverfahren liegen drei Prinzipien zugrunde (KRAUSE, 1961):

1. Zuführung von Nähr-, Schutz- und Puffersubstanzen bei der Vergrößerung des Ejakulatvolumens ("Verdünnung");
2. Senkung des Stoffwechsels der Samenzellen;
3. Hemmung des Wachstums etwa vorhandener apathogener oder pathogener Keime.

Diese Erfordernisse werden bei den einzelnen Methoden der Samenkonservierung auf unterschiedliche Weise erfüllt.

2. Salinische Samenverdünnungsverfahren.

In den Jahren von 1930 bis 1950 kamen praktisch nur Verdünner, deren Wirkungsmechanismus auf den darin gelösten Phosphat-, Zitrat- oder Tartrat-Puffersalzen beruhte, zur Anwendung.

Durch die Einfügung der genannten Salze in einen Samenverdünner soll eine Abpufferung der als Stoffwechselprodukt der Spermien anfallenden Milchsäure erreicht werden.

Zur Erhaltung der Lebens- und Befruchtungsfähigkeit der Spermien in der Verdünnung erweist sich die Zugabe von Nährsubstanzen als erforderlich, da sich der natürliche Fruktosegehalt der Spermien durch den hohen Stoffwechsel der Samenzellen schnell erschöpft. Neben den schon vorher verwendeten Nährstoffen, wie Fruktose oder Glukose, brachte der 1939 durch PHILLIPS empfohlene Zusatz von Ei-

dotter zu den Verdünnungsflüssigkeiten einen weiteren Fortschritt (KÜST - SCHAETZ, 1954).

Gewisse Schutzkolloide haben eine lebensverlängernde Wirkung auf die Spermien, indem sie durch Bildung einer Schutzhülle schädliche Einflüsse von ihnen fernhalten. Der Zusatz von frischem Eidotter (10 bis 100 %) hat sich vor allem als Schutz gegen den Kälteschock hervorragend bewährt (HOELZER, 1951).

Nach EIBL (1959) geben Eidotterzusätze in der Höhe von 12,5 % einen optimalen Schutzeffekt gegen den Kälteschock. Diese Eidotterkonzentration erhält die Lebensfähigkeit der Spermien am längsten. Die höchste Beweglichkeit der Samenzellen wird jedoch erst erreicht, wenn mindestens 20 % Eidotter im Samenverdünner vorhanden sind. Es müssen also im Eidotter noch andere Faktoren für die Aufrechterhaltung der besten Beweglichkeit der Spermien vorhanden sein, als nur allein der Schutzfaktor. Einer von ihnen ist nach EIBL (1959) die Viskosität. Auf einer Erhöhung der Viskosität beruht auch der die Aktivität der Spermien in vitro verlängernde Effekt des Gelatinezusatzes. Eine erhöhte Menge Eidotter schafft ähnliche Bedingungen.

Zur Hemmung der stets im Samen enthaltenen pathogenen und apathogenen Keime werden den Verdünnern Sulfonamide und Antibiotika in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen zugesetzt. Frisch gewonnenes Bullensperma enthält selbst bei sorgfältigster Entnahme eine beträchtliche Zahl von Bakterien, die durch ihre toxischen Stoffwechselprodukte und durch den Verbrauch von Nährstoffen das Sperma schädigen. Weitere Keime kommen durch Zugabe von Eidotter und durch die Arbeitsvorgänge bei der Verdünnung und Aufbewahrung hinzu (ULLNER, 1957). Durch den Zusatz der in Deutschland am häufigsten verwendeten "Antibiotika-Schere" der Fa. MACK, Illertissen, kann das Keimwachstum im Samenverdünner weitgehend gehemmt werden (AEHNELT,

1951, HOELZER, 1951, GÖTZE u. RATH, 1953, BONFERT, 1953, BAIER u. Mitarbeiter, 1955, A. BONFERT u. Mitarbeiter, 1955, ULLNER, 1957).

Die "Antibiotika-Schere" setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 250 IE Penicillin, 250 Gamma Streptomycin und 250 Gamma Polymyxin pro ml verdünnten Samens.

a. Spermasol-Verdünner

Der Samenverdünner Spermasol der Fa. MACK, Illertissen, stellt eine Weiterentwicklung des von SALISBURY und Mitarbeitern im Jahre 1941 beschriebenen Eidotter-Natrium-Zitrat-Puffers dar (KRAUSE, 1961).

Der aus Natrium-Zitrat und Kaliumhydrogenphosphat zusammengesetzten, auf einen optimalen pH-Wert von 6,8 eingestellten Verdünnungsflüssigkeit ist ein Gelatine-Abbauprodukt beigefügt. Durch diesen Zusatz wird nicht nur die Schutzkolloidwirkung des Eidotters (Spermasol erhält einen Zusatz von 20 % Eidotter) verstärkt, sondern vor allem bei Kühlschranktemperaturen auch die Viskosität der Spermaverdünnung soweit erhöht, daß sich die Beweglichkeit der Spermien und damit vielleicht auch ihr Stoffwechsel erniedrigen. Außerdem wird ein Sedimentieren des Spermas beim Aufbewahren und Versand verhindert. Zur Keimhemmung kommt die oben beschriebene "Antibiotika-Schere" zur Anwendung (Fa. MACK, Illertissen, 1960).

Der Spermasol-Verdünner hat sich seit einer Reihe von Jahren einen festen Platz in den deutschen Besamungsstationen erworben.

Nach in-vitro-Versuchen erprobte HOELZER (1951) den Spermasol-Verdünner auch in einem neunmonatigen Praxisversuch. In umfangreichen Reihenversuchen wurden Spermasol-A und Spermasol-N vergleichend mit einem Na-Zitrat-

Verdünner geprüft. Spermasol-A und Spermasol-N - beides Produkte der Firma MACK, Illertissen - unterscheiden sich lediglich in ihrem Gelatinegehalt. Spermasol-N enthält einen 25 % geringeren Gelatineanteil als Spermasol-A.

Bei der mikroskopischen Beweglichkeitsbeurteilung des verdünnten Samens kam HOELZER zu den in der Tabelle I aufgeführten Resultaten:

Verdünner / Konservierungsdauer:	Vorwärtsbewegung der Spermien in Prozent				
	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.	120 Std.
Spermasol-A	85	90	83	74	58
Spermasol-N	86	86	80	68	54
Na-Zitrat-Verdünner	90	83	55	46	40
unverdünnter Samen	85	72	48	41	24

Tabelle I: Aktivität der Spermien bei vergleichenden Untersuchungen von 25 Samenproben.

Die Spermasol-Verdünner enthielten 20 % Eidotter. Der Verdünnungsgrad lag bei allen Verdünnern bei 1 : 2. In den angeführten Reihenversuchen zeigten sich die Spermasol-Verdünner gegenüber dem unverdünnten und dem mit Eidotter-Zitrat verdünnten Samen ganz erheblich überlegen.

Der Praxisversuch brachte folgende Ergebnisse:

Alter des Samens:	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.
Zahl der Besamungen	1040	754	336	72
davon tragend	846	628	254	44
davon nicht tragend	194	126	82	28
Befruchtungssatz:	81,3 %	83,3 %	75,6 %	61 %

Tabelle II: Erstbesamungsergebnisse mit verschieden altem Spermasol-Samen.

Der mit Spermasol verdünnte Samen war am dritten Tag noch gut befruchtungsfähig und am vierten Tag nach der Entnahme noch beschränkt für die Besamung einsatzfähig. Der Verdünnungsgrad variierte je nach Güte des Samens: sehr guter Samen wurde von 1 : 4 bis 1 : 6, guter Samen von 1 : 3 bis 1 : 4 und ausreichender Samen 1 : 2 mit Spermasol verdünnt.

HOELZER (1951) faßt die Vorteile, die sich bei der Verwendung des Spermasolverdünners ergeben, wie folgt zusammen:

1. die samenkonservierenden Eigenschaften des Spermasols sind gegenüber dem Zitrat-Verdünner so groß, daß guter Samen am zweiten und dritten und mit einigen Einschränkungen auch am vierten Tag nach der Entnahme und Verdünnung in der Praxis verwendet werden kann.

2. Die durch die Gelatine erhöhte Viskosität bringt es mit sich, daß der Samen beim Transport ruhig gestellt wird; zur Kältestarre kommt so die mechanische Starre mit weiter herabgesetztem Stoffwechsel.

3. Die Gelatine ist außerdem ein Schutzkolloid und erhöht so die Wirkung des Eidotters.

4. Es tritt keine Sedimentierung des Samens ein; die Samenzellen sind in gleichmäßiger Suspension verteilt; ein Aufschütteln vor der Verwendung ist nicht nötig.

5. Durch den Antibiotikazusatz wird das Bakterienwachstum gehemmt.

In einem Laborversuch prüfte AEHNELT (1951) anhand der Beurteilung des Anhaltens der Intensität der Vorwärtsbeweglichkeit Eidotter-Zitrat-Verdünner vergleichend mit dem Spermasol-Verdünner. Bei der Beurteilung der "Be-

fruchtungsfähigkeit" des verdünnten Samens erwies sich der Spermasol-Verdünner bei einem Verdünnungsgrad von 1 : 2 um etwa 30 % und bei einem Verdünnungsgrad von 1 : 5 um etwa 100 % dem Eidotter-Zitrat-Verdünner überlegen. Unter voller Befruchtungsfähigkeit wird der Zeitraum in Stunden verstanden, in dem noch mindestens 70 % der Spermien eine Vorwärtsbewegung zeigen. Aufgrund der Versuchsergebnisse wird der Verwendung des Spermasol-Verdünners ein Verdünnungsgrad von 1 : 2 bis 1 : 6 empfohlen. Bei höheren Verdünnungen ist mit einem Rückgang der Befruchtungsfähigkeit des verdünnten Samens zu rechnen. AEHNELT (1951) schließt aus seinen in vitro erzielten Versuchsergebnissen, daß der Spermasol-Verdünner unter Zusatz von 20 % Eidotter zum damaligen Zeitpunkt die beste in Deutschland verwendete Verdünnungsflüssigkeit für Bullensamen sei.

AEHNELT weist aber auch gleichzeitig auf die Nachteile aller Eidotter-Verdünner hin:

1. Die Herstellung der Eidotter-Verdünnung ist umständlich, die Beschaffung frischer Eier im Winter manchmal mit Schwierigkeiten verbunden.
2. Eidotter ist nicht unbedingt keimfrei, ist zersetzlich und stellt einen günstigen Nährboden für Keime aller Art dar.
3. Der Eidotter-Verdünner ist nicht sterilisierbar und somit nur kurze Zeit haltbar.
4. Eidotter ist in seiner Zusammensetzung und damit auch in seiner Wirkung auf die Samenzellen nicht konstant. Bezüglich der Beschaffenheit der Hühnereidotter bei verschiedener Fütterung und Haltung bestehen erhebliche Unterschiede.

Da somit der Eidotterzusatz immer einen Unsicherheitsfaktor bei der Verdünnung darstellt und auch sonst erhebliche Nachteile aufweist, sieht AEHNELT den Eidotter-

Verdünner keinesfalls als idealen Verdünner an. Er fordert, eine eidotterfreie Verdünnungsflüssigkeit für Bullensperma zu entwickeln, die eine den Eidotter-Verdünnern noch überlegene Lebenderhaltung der Samenzellen ermöglicht. Ein solcher Verdünner soll keimfrei, sterilisierbar, haltbar und vor allen Dingen in seiner Zusammensetzung und damit in seiner Wirkung auf die Spermien konstant sein (zit. nach AEHNELT, 1951).

3. Milch als Grundlage für Samenverdünner.

In den Jahren 1948 bis 1949 stellten PRACHOFF und HADJISKY (1951) fest, daß die abgekochte Milch alle Eigenschaften einer guten Pufferlösung besitzt. Nach der chemischen Zusammensetzung, nach Relativgewicht, Gefrierpunkt, pH u.a. steht die Milch dem Spermaplasma der entsprechenden Tierart nahe. Infolge des hohen Gehaltes an organischen Phosphaten übt die Milch eine protektive Wirkung auf die lipoproteide Kapsel der Samenzellen aus. Als kolloides Mittel stabilisiert die Milch die elektrischen Ladungsverhältnisse der Spermien, verhindert die Agglutination und mindert die Gefahr eines Temperaturschocks.

Im milchverdünnten Samen wirken die Eiweißkörper der Milch als Schutzkolloid für die Spermien (SAKALA u. TURECEK, 1958).

ALBRIGHT und Mitarbeiter (1958) weisen daraufhin, daß die Spermien in Milchverdünnern ausgezeichnete Bewegungen zeigen. Sie nehmen an, daß die Samenzellen gewisse Bestandteile der Milch (Lactose?) zur Erhaltung des Stoffwechsels nutzen.

PETERS (1953) kommt zu dem Ergebnis, daß die Konservierungseigenschaften von Magermilch und Vollmilch gleich sind; bezüglich der Befruchtungsquoten bestehen keine Unterschiede. Er rät jedoch, ebenso wie WEISS (1952), von der

Verwendung sterilisierter Vollmilch bzw. homogenisierter Milch als Verdünnungsflüssigkeit ab, da die mikroskopische Untersuchung und Beurteilung des mit diesen Milcharten verdünnten Samens durch die Fettkügelchen sehr erschwert wird.

a. In-vitro-Versuche.

Die Konservierungseignungen des Eidotter-Zitrat-Verdünners, des Spermasol-Verdünners und des Trockenmagermilch-Verdünners wurden von KRAWARIK (1957) in vitro geprüft. Allen drei Verdünnern wurden pro ccm 1000 IE Natrium-Penicillin-G und 1000 IE Dihydro-Streptomycinsulfat zugesetzt. Der verdünnte Samen wurde 8 Tage konserviert und täglich einer mikroskopischen Prüfung der Beweglichkeit unterzogen.

Bei Verwendung von Eidotter-Zitrat-Verdünner und Trockenmagermilch-Verdünner blieb der verdünnte Samen 6 bis 7 Tage voll befruchtungsfähig, d.h. mindestens 70 % der Spermien zeigten Vorwärtsbewegung. Spermasolverdünnter Samen war beiden unterlegen. Hier währte die volle Befruchtungsfähigkeit in der Regel nur 5 Tage.

In vergleichenden Reagenzglasversuchen wurden Eidotter-Zitrat, pasteurisierte Magermilch mit Eidotter- und Zitratzusatz, sowie erhitzte Magermilch (für 10 Min. auf 92 bis 93°C) in ihrer Eignung als Samenverdünner geprüft. Zu allen drei Verdünnern wurden pro 100 ccm 0,3 % (g/V) Sulfanilamid, 0,2 % (g/V) Dihydro-Streptomycinsulfat und 100 000 IE Penicillin hinzugefügt. Die erhitzte Magermilch war zwar dem Eidotterzitrat etwas unterlegen, jedoch besser geeignet als die Magermilch-Eidotter-Zitrat-Kombination (VAN DEMARK u. COUTURIER, 1958).

DESELAERS (1959) erprobte verschiedene Handelsmilchsorten im Vergleich zum Spermasol auf ihre Brauchbarkeit zur Verdünnung von Rindersperma. Bei den in vitro durchgeführten Versuchen stellte sich heraus, daß in Spermasol-N

konservierter Samen eine längere Lebensdauer besitzt als Samen, der mit Milch verdünnt wurde. Als Ersatz für den Spermasol-N-Verdünner erscheint dem Verfasser nur ein Magermilch-Eidotter-Verdünner (20 % Eidotter) annähernd geeignet zu sein.

b. Besamungsversuche.

Erste Versuche von PHILLIPS (GÖTZE, 1949) im Jahre 1939, Milchpulver zur Verdünnung von Bullensperma zu verwenden, verliefen unbefriedigend. Erst in den Jahren nach dem letzten Kriege wurden die ersten erfolgreichen Arbeiten mit milchverdünntem Samen bekannt. Es wurden sowohl abgekochte Milch ohne fremde Zusätze, als auch abgekochte Milch mit verschiedenen Zusätzen (Antibiotika, Eidotter, Glycerin und Maisstärke) als Verdünnerbestandteile mit wechselndem Erfolg erprobt.

b 1. Abgekochte Milch ohne fremde Zusätze als Samenverdünner für Wiederkäuer- und Hengstsperma.

PRACHOFF und HADJISKY (1951) verwendeten in einem Praxisversuch, der in den Jahren 1948 und 1949 durchgeführt wurde, abgekochte Kuhmilch als Samenverdünner bei Kühen, Schafen und Ziegen. Die guten Ergebnisse der Besamungsergebnisse - es wurden bei 87 Kühen 68,9 %, bei 13 Färsen 61,5 %, bei 1885 Schafen 91,0 % und bei 20 Ziegen 82 % Erstbesamungserfolge erzielt - sprechen für die Eignung der abgekochten Kuhmilch als Spermaverdünner.
In Bulgarien wurden im Jahre 1950 33 445 Schafe mit einem Samenverdünner aus abgekochter Kuhmilch bei einem durchschnittlichen Befruchtungshundertsatz von 91,9 % besamt (PRACHOFF, 1958).

KONSTANTINOW (1955) verdünnte mit frischgemolkener, aufgekochter und dann auf 28 bis 30°C abgekühlter Kuhmilch Bullensperma. Der so verdünnte Samen gelangte bei 956 Kühen zum Einsatz. Die Befruchtungsquote betrug 92,3 %.

Bei vergleichsweise mit Glukosephosphat verdünntem Samen, der bei 8000 Kühen verwendet wurde, lag der Befruchtungshundertsatz bei 92,8 %. Der Verfasser schlägt aus wirtschaftlichen Erwägungen vor, den Glukosephosphat-Verdünner durch den gleichwertigen Milch-Verdünner zu ersetzen. MELROSE und Mitarbeiter (1958) erreichten bei 10 189 Erstbesamungen mit einem Trockenmagermilch-Verdünner (g/V) bessere Erstbesamungskonzeptionsraten, als mit Eidotter-Zitrat-Verdünner (68,4 % : 63,5 %).

Abgekochte Stutenmilch als Verdünnungsmittel für Hengstsperma wurde zuerst im Jahre 1949 von MICHAILOFF mit Erfolg angewendet. Bei 28 Stutenbesamungen konnte mit dieser Verdünnung eine Konzeptionsrate von 89,2 % erreicht werden. Auch in den folgenden beiden Jahren bewährte sich die abgekochte Stutenmilch als Konservierungsflüssigkeit. So konnte MICHAILOFF im Jahre 1950 bei 88 Stuten 93 bis 94 % und im Jahre 1951 bei 59 Stuten 72,4 bis 91,5 % Erstbesamungserfolge verzeichnen (zit. nach PRACHOFF, 1958).

b 2. Milchverdünner in der Rinderbesamung unter Hinzufügung verschiedener Zusätze.

Am Forschungsinstitut für Künstliche Besamung des Pensylvania State College (1952) wurden vergleichsweise Eigelb-Zitrat-Verdünner und Verdünner aus pasteurisierter und homogenisierter Vollmilch sowie Magermilch untersucht.

Diese Milchsorten als Verdünnungsgrundlage erwiesen sich dem Eigelb-Verdünner als ebenbürtig, mußten aber aufgekocht werden. Zum Milch-Verdünner wurde pro 10 ccm Milch ein Tropfen einer 10 %igen Streptomycinlösung gegeben. Dadurch konnten bessere Ergebnisse als bei Verwendung des Milchverdünners ohne Antibiotika erzielt werden.

JAQUET und CASSOU (1952) verbesserten durch die Verwendung eines Trockenmagermilch-Verdünners (1 : 10 in Aqua bidest. gelöst), dem 10 % Eidotter beigefügt waren, das Befruch-

tungsergebnis wesentlich. Während im Durchschnitt der Monate Januar bis Juli 1951 bei Verwendung des Eidotter-Zitrat-Verdünners 48,7 % der Kühe tragend wurden, gelang es in den Monaten Mai bis November 1951 durch die Anwendung des Magermilch-Eidotter-Verdünners, die Konzeptionsrate auf 60,4 % zu heben.

WEISS (1952) verwendete im Jahre 1952 folgenden Verdünner: Molkerei-Magermilch plus 2 % Eigelb. Gegen die Milchsäuerung gab er einen Tropfen 10 %ige Streptomycinlösung auf 10 ccm Milch. Mit diesem Verdünner wurden 1000 Kühe besamt. Die Befruchtungsquote (90 Tage non-return-Rate) betrug 67,8 %. Zur gleichen Zeit wurden 8500 Kühe mit Samen, verdünnt mit Eidotter-Zitrat, besamt. Hierbei lag die Befruchtungsrate bei 67,6 % (90 Tage non-return-Rate). Durch die Verwendung des Magermilch-Verdünners konnte also keine Hebung der Konzeptionsrate beobachtet werden.

In drei Versuchsreihen kam PETERS (1953) zu dem Ergebnis, daß ein Verdünner, hergestellt aus reiner Magermilch ohne Zusätze, dem Eidotter-Spermasol-Verdünner eindeutig unterlegen ist. In einem anderen Versuch wurde dem Magermilch-Verdünner 10 % Eidotter zugesetzt. Die Befruchtungsergebnisse waren bei Verwendung dieses Verdünners den mit Spermasol-Verdünner erzielten gleichwertig.

Von ALMQUIST und Mitarbeitern (1954) wurden erhitzte Vollmilch ohne (Gruppe I) und mit Zusatz von 10 g/l Maisstärke (Gruppe II) bezüglich ihrer Eignung als Spermaverdünner mit Eidotter-Zitrat-(Gruppe III) verglichen. Maisstärke wurde zugegeben, um die gleiche Viskosität wie beim Eidotter-Verdünner zu erhalten und um das Ablaufen des verdünnten Samens aus der Besamungspipette zu verhindern. Der Antibiotika-Zusatz betrug jeweils 1000 IE Penicillin und Streptomycin pro ccm Verdünner. Die Verdünnung war so eingestellt, daß pro cmm Besamungsdosis mindestens 150 000 Spermien vorhanden waren. Es wurden mit jedem der

drei Verdünner jeweils 1600 Besamungen an Färsen durchgeführt. Die Ergebnisse - Gruppe I = 76,1 %, Gruppe II = 74,3 %, Gruppe III = 75,9 % - wurden nach dem 60 - 90 Tage non-return-Verfahren ermittelt. Der verdünnte Samen war bei seiner Anwendung 0 bis 3 Tage alt.

In einem zweiten Versuch wurden Vollmilch, Magermilch und Eidotter-Zitrat als Verdünnungsflüssigkeiten an Färsen durch 8399 Erstbesamungen geprüft. Den Milchverdünnern war ebenfalls 10 g/l Maisstärke zugesetzt. Als antibiotischer Schutz wurde bei allen drei Verdünnern pro ccm verdünnten Samens je 1000 IE Penicillin und 1000 IE Streptomycin verwendet. Der Eidotter-Zitrat-Verdünner enthielt außerdem noch 300 mg/% Sulfanilamid. Auch die non-return-Raten dieses Versuches - Samenverdünner bestehend aus Vollmilch = 65,3 %, Magermilch = 67,8 %, Eidotter-Zitrat = 66,8 % - lassen keinen signifikanten Unterschied zwischen den zur Anwendung gelangten Verdünnern erkennen. Der Verdünnungsgrad lag zwischen 1 : 50 bis 1 : 150.

Weiterhin wurde von ALMQUIST (1954) erhitzte Vollmilch mit und ohne Antibiotikazusatz als Verdünnungsflüssigkeit in zwei Großversuchen mit Antibiotika enthaltendem Eidotter-Zitrat-Verdünner verglichen. Der Antibiotikazusatz betrug jeweils 1000 IE Penicillin und Streptomycin pro ccm verdünnten Samens. Bei 6670 Erstbesamungen an Färsen wurden folgende non-return-Raten erzielt:

1. Homogenisierte Milch mit Antibiotika: 72,1 %
2. Homogenisierte Milch ohne Antibiotika: 66,2 %
3. Eidotter-Zitrat mit Antibiotika: 64,1 %

Bei Aufteilung nach vorher gut (64 bis 72 %) und schlechter (57 bis 63 %) befruchteten Bullen zeigten die schlechten Befruchter eine Verbesserung von 11,5 % bei Anwendung

des Milch-Antibiotika-Verdünners gegenüber Eidotter-Zitrat-Verdünner. Es wurden folgende Werte errechnet:

	Eidotterzitrat	Milch + Antibiotika
1. gute Befruchter	68,8 %	73,0 %
2. schlechte Befruchter	59,0 %	70,5 %

Ein zweiter Versuch bestätigte diese Ergebnisse:

	Eidotterzitrat	Milch + Antibiotika
1. gute Befruchter	69,3 %	72,7 %
2. schlechte Befruchter	55,9 %	68,3 %

Dem zweiten Versuch lagen 8400 Besamungen an Färsen zugrunde. Die Verdünnungsgrade lagen bei beiden Versuchen zwischen 1 : 25 bis 1 : 50.

ADLER und RASBECH (1956) konnten bei 7564 Erstbesamungen die Konzeptionsraten (60 - 90 Tage non-return) von 63,6 % auf 69,4 % erhöhen, als sie den Eidotter-Zitrat-Verdünner durch pasteurisierte erhitzte Magermilch (für 10 Min. auf 92 - 93°C) ersetzten. Als dritter Verdünner wurde in diesem Versuch homogenisierte und sterilisierte Sahne (9 % Butterfettgehalt) verwendet. Hierbei betrug der Befruchtungserfolg 69,2 % (60 - 90 Tage non-return-Rate).

EIBL (1959) prüfte einen kombinierten Magermilch-Eidotter-Zitrat-Verdünner (70 % Magermilch, 15 % Natrium-Zitrat 2,8 %ig, 15 % Eidotter) und einen Eidotter-Zitratpuffer bei 12 000 Erstbesamungen.

In folgender Aufstellung wird eine Ergebnisübersicht gegeben:

	non-return-Rate 1. + 2. Tag	3. Tag
Eidotter-Zitrat-Verdünner	66,19 %	61,60 %
Magermilch-Zitrat-Verdünner	64,05 %	54,88 %

Die Befruchtungsergebnisse des mit Eidotter-Zitrat verdünnten Samens lagen am ersten und zweiten Tage der Anwendung des verdünnten Samens um 2,14 %, am dritten Tage um 6,72 % über den Befruchtungsquoten, die mit dem kombinierten Magermilch-Verdünner erzielt werden konnten.

b 3. Glycerin als Zusatz zum Milch-Verdünner.

Die Entdeckung von POLGE und Mitarbeitern (1949), daß durch einen 40 %igen Glycerin-Zusatz Geflügelsamen vor den schädlichen Einwirkungen des Gefrier- und Auftauprozesses bei der Tiefgefrierung weitgehend geschützt werden kann, gab Veranlassung zu überprüfen, ob das Glycerin unter bestimmten Voraussetzungen auch einen positiven Einfluß auf die Haltbarkeit des bei Kühlschranktemperatur aufbewahrten Samens hat. Über den Wirkungsmechanismus des Glycerins, seinen Einfluß auf die lebenden Spermien, ist bisher wenig bekannt. Einige Autoren geben interessante Hinweise.

Nach DE GROOT (1956) dringt das Glycerin infolge der Erhöhung des osmotischen Druckes im Verdünner durch die Zellmembran in das Protoplasma der Spermien ein. Unter Verwendung von Glycerin, in das radioaktiver Kohlenstoff - C_{14} eingefügt war, konnte nachgewiesen werden, daß die

Spermien das Glycerin aufnehmen und im Stoffwechsel verarbeiten (O'DELL u. Mitarbeiter, 1956). Das Glycerin sammelt sich hauptsächlich in der Kernzone der Spermien, weniger im Mittel- und Schlußstück (PICKETT, 1958). Als weiterer Beweis dafür, daß die Spermien das Glycerin in sich aufnehmen, ist die Tatsache anzusehen, daß die Spermienköpfe keine Formveränderungen zeigen.

Der Abbau des Glycerins ist an das Vorhandensein lebender Spermien gebunden (MANN u. WHITE, 1956). Die Samenzellen nehmen unter aeroben Bedingungen Glycerin bei 37°C unter vermehrtem Sauerstoffverbrauch und Anzeichen der Milchsäurebildung im Suspensionsmedium auf. Die anaerobe Fruktolyse wird durch die Anwesenheit von Glycerin nicht gehemmt.

SOKOLOWSKAJA und Mitarbeiter (1953) weisen auf die bakteriostatischen Eigenschaften des Glycerins hin. Sie verwenden anstelle von Antibiotika in einem Verdünner reines medizinales Glycerin. Dieser Verdünner enthält in 100 ccm Flüssigkeit folgende Zusätze: 0,5 g Glykokoll, 2,3 g Natrium-Zitrat, 2,8 ccm Glycerin, 12 ccm Eidotter und 0,007 g Mucinaseextrakt. Die Lebens- und Befruchtungsfähigkeit des mit diesem Verdünner konservierten Samens ist besser als bei Anwendung eines gewöhnlichen Natrium-Zitrat-Eidotter- oder Glykokoll-Verdünners mit Antibiotika.

Auch JOYNER (1954) stellte eine antibakterielle Wirkung des Glycerins fest. Lebende Trichomonaden aus Spülproben infizierter Bullen und Trichomonaden eines Kulturstammes wurden einem mit Eidotter-Zitrat verdünnten Samen zugesetzt. Nach Zusatz von 10 % Glycerin zum Verdünner werden die Erreger beim Tiefkühlverfahren absolut zuverlässig vernichtet. Wenn der Samen bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt wird, ist zur Abtötung der Trichomonaden eine Konzentration von 20 % Glycerin im verdünnten Samen erforderlich. Da aber eine 20 %ige Glycerin-Konzentration über die Glycerinverträglichkeit der Spermien im verdünnten Samen hinausgeht, ist dieses Verfahren nicht brauchbar.

Wichtig für die Samenkonservierung mit glycerinhaltigen Verdünnern ist die durch die Anwesenheit des Glycerins bedingte Gefrierpunktserniedrigung des verdünnten Samens. Unverdünnter Samen hat einen Gefrierpunkt von -0,53°C (±0,005°C). Während ein 2,9 %iger Natrium-Zitrat-Verdünner den Gefrierpunkt des verdünnten Samens nur unwesentlich beeinflußt - die Werte liegen zwischen -0,53°C bis -0,60°C - sinkt der Gefrierpunkt bei Anwendung eines 10 %igen Glycerin-Verdünners auf -2,8°C (DE GROOT, 1956).

RULFESS (1951) prüfte Kombinationen von 100 Teilen Natrium-Zitrat-Verdünner und 5 - 100 Teilen Glycerin mit der Absicht, das Eidotter im Samenverdünner durch Glycerin zu ersetzen. Er stellte fest, daß Glycerin Eidotter nicht ersetzen kann.

HOLT (1953) berichtet von einer Steigerung der Fruchtbarkeit des Bullensamens, wenn er einem Eidotter-Zitrat-Verdünner 10 % Glycerin zusetzte. Das Sperma der Bullen reagierte verschieden. Bei einer Bullengruppe wurden die Erstbesamungsergebnisse durch Beigabe von 10 % Glycerin von 59,3 % auf 67,0 % angehoben.

Eine zweite Bullengruppe veränderte sich nur von 66,0 % auf 66,7 %. Im Endergebnis war also die Konzeptionsrate in beiden Gruppen annähernd dieselbe. Der Verfasser macht darauf aufmerksam, daß durch die Zugabe von Glycerin schlechter Samen verbessert werden kann, die Qualität relativ guten Samens aber nicht geändert wird.

MILLER und VAN DEMARK (1954) setzten einen glycerinhaltigen Natrium-Zitrat-Verdünner bei +5°C langsam dem Sperma zu. Obwohl die Verfasser feststellen konnten, daß die Spermien auch eine Konzentration von 30 % Glycerin im Samenverdünner ohne Schädigungen vertragen, halten sie einen 7 %igen Glycerinzusatz für optimal.

Die Haltbarkeit des Samens bei Kühlschranktemperatur konnte MC LEAN (1956) verdoppeln, wenn er zu einem Vollmilch-

Verdünner 10 % Glycerin gab. Auch beim Trockenmagermilch-Verdünner (9 % Trockenmagermilch in Aqua dest. gelöst) konnte durch Zugabe von Glycerin in steigenden Konzentrationen (1,25 %; 2,5 %; 5 %; 10 %) die Aufbewahrungsdauer verlängert werden (WILLET u. OHMS, 1956). Dieser Verdünner wurde einem glycerinfreien Trockenmagermilch-Verdünner und einem Eidotter-Zitrat-Verdünner gegenübergestellt. Die drei Verdünner enthielten pro ccm 500 IE Dihydro-Streptomycin-sulfat. Der verdünnte Samen wurde bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt. In vitro war der glycerinhaltige Magermilch-Verdünner sowohl dem Eidotter-Zitrat-Verdünner, als auch dem reinen Magermilch-Verdünner eindeutig überlegen. In einem praktischen Versuch (OHMS u. WILLET, 1957) zeigte es sich, daß ein Glycerinzusatz von 5 % die non-return-Rate des Magermilch-Verdünners von 48,0 % auf 49,2 % heben kann, ohne aber die Befruchtungsquote des mit Eidotter-Zitrat verdünnten Samens zu erreichen.
Die in nachfolgender Übersicht gezeigten Ergebnisse wurden nach dem 60 bis 90 Tage non-return-Verfahren ausgewertet:

Befruchtungsquoten bei Anwendung des verdünnten Samens am ersten Tag:

	Eidotter-Zitrat	Magermilch	Magermilch-Glycerin
Zahl der Erstbesamungen	365	382	388
non-return-Rate in %	75,3	48,0	49,2

Befruchtungsquoten bei Anwendung des verdünnten Samens am zweiten Tag:

	Eidotter-Zitrat	Magermilch	Magermilch-Glycerin
Zahl der Erstbesamungen	318	348	340
non-return-Rate in %	64,6	45,6	44,4

Die Verfasser weisen darauf hin, daß der Befruchtungsabfall bei Anwendung der Milch-Verdünner langsamer erfolgt als beim Eidotter-Zitrat-Verdünner.

SIKES und MERILAN (1958) verglichen Magermilch-Verdünner mit und ohne 10 % Eidotter und Eidotter-Zitrat-Verdünner. Zu allen drei Verdünnern wurden 8 % Glycerin gegeben. Der verdünnte Samen wurde bei Temperaturen von 0 bis +3°C aufbewahrt. Im Eidotter-Milch-Glycerin-Verdünner zeigten die Spermien noch nach 74 Tagen Vorwärtsbewegung. Die Verfasser empfehlen als beste Kombination folgenden Verdünner:

82 % Magermilch, 10 % Eidotter und 8 % Glycerin.

O'CONNOR und SMITH (1959) kamen bei 14 319 Erstbesamungen mit 2 Magermilch-Verdünnern mit und ohne Glycerin - beiden waren Antibiotika zugesetzt - zu dem Ergebnis, daß lediglich am vierten Tage nach der Verdünnung des Samens der Magermilch-Glycerin-Verdünner ein besseres Befruchtungsergebnis bringt. Am vierten Tage nach der Verdünnung des Samens betrug die non-return-Rate für den Magermilch-Glycerin-Verdünner 60,6 %, für den reinen Magermilch-Verdünner jedoch 50,0 %. Es wird empfohlen, bei Konservierung des Samens für mehrere Tage den glycerinhaltigen Verdünner zu verwenden.

Bei vergleichenden Untersuchungen eines Magermilch-Verdünners mit und ohne Glycerin konnte ALMQUIST (1959) feststellen, daß ein Glycerinzusatz von 10 % - bei einem Verdünnungsgrad von 1 : 25 bis 1 : 50 - den bis daher angewandten Milch-Verdünner (ALMQUIST u. Mitarbeiter, 1954) erheblich verbessert. In einem Versuch mit 200 000 Tieren verbrauchte ALMQUIST einen mit Magermilch verdünnten Samen zu 95 % innerhalb der ersten 25 Stunden nach der Entsamung. Es wurde ein non-return-Ergebnis von 71 % erzielt. Obwohl der mit Milch-Glycerin verdünnte Samen, der bei 144 000 Besamungen zur Anwendung kam, zu 44 % nach dem ersten Tage verwendet wurde (12 % am 3. und 4. Tag), lag das Befruchtungsergebnis bei 73 % (60 bis 90 day non-return). Dieses

Ergebnis liegt 2 % über dem Durchschnitt der Jahre 1954, 1955 und 1956, in denen mit Milch-Verdünner bei hauptsächlich eintägiger Nutzung gearbeitet wurde.

b 4. Zubereitung des Milch-Glycerin-Verdünners nach ALMQUIST (1959).

1. Es kann sowohl homogenisierte als auch frische Magermilch angewendet werden.
2. Erhitzen der Milch in einem Wasserbad für 10 Min. auf 93,3°C.
3. Die Milch wird auf Zimmertemperatur im Wasserbad abgekühlt. Die Milchhaut darf nicht verwendet werden.
4. Die Milch wird in gleiche Teile (A + B) geteilt. Die Hälfte der Milch wird nach Hinzufügung von 20 Volumenprozent Glycerin im Kühlraum auf +5°C abgekühlt.
5. Beiden Teilen des Verdünners werden je 500 IE Penicillin und Streptomycin pro ccm zugesetzt. Die Antibiotika können in Wasser oder Milch gelöst werden.
6. Beide Verdünnerfraktionen sind damit fertig und können bei +5°C ein oder zwei Tage aufbewahrt werden.
7. Die Verdünnung des frisch gewonnen Samens bis zur halben Endmenge mit Teil A geschieht möglichst schnell nach der Entsamung bei Zimmertemperatur.
8. Innerhalb 2 Stunden wird der vorverdünnte Samen auf +5°C heruntergekühlt.
9. Nach erfolgter Abkühlung Hinzufügen von Teil B in drei Fraktionen in je 10-Minuten-Abständen (1. Fraktion 20 %, 2. Fraktion 30 %, 3. Fraktion 50 % des Gesamtvolumens des Verdünners B).
10. Vorsichtig mischen und sofort abfüllen.

C. Eigene Untersuchungen

I. Allgemeines zur Versuchsanordnung.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte der von ALMQUIST (1959) empfohlene Magermilch-Glycerin-Verdünner vergleichend mit dem Spermasol-N-Verdünner in vitro und in vivo geprüft werden. Es sollte festgestellt werden, ob sich die Befruchtungserfolge, die von ALMQUIST bei Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners zur Samenkonservierung erzielt werden konnten, auch unter den Voraussetzungen, die auf deutschen Besamungsstationen gegeben sind, realisieren lassen.
Um einen Überblick über die Wirksamkeit der einzelnen Bestandteile des Magermilch-Glycerin-Verdünners auf den verdünnten Samen zu erhalten und Erfahrungen über den besten Verdünnungsmodus zu sammeln, sollen zunächst einmal durch in-vitro-Versuche alle Verdünnerbestandteile einzeln und in Kombinationen zueinander einer kritischen Prüfung unterzogen werden. Anschließend soll geprüft werden, ob die aus den in-vitro-Versuchen abzuleitenden Erwartungen durch den Einsatz von mit Magermilch-Glycerin verdünntem Samen in der Besamungspraxis bestätigt werden können.

Für die Versuche standen 42 Bullen der Zentralbesamungsstation Schönböken zur Verfügung, deren Kennzeichnung in vorliegender Arbeit durch eine willkürlich durchgehende Numerierung von 1 bis 42 erfolgt. Die in-vitro-Versuche konnten sich, da sie in den Hauptbesamungsmonaten Dezember 1959 und Januar 1960 durchgeführt wurden, leider nur auf ein sehr begrenztes Bullenmaterial stützen.

In Anbetracht der Zweiteilung der eigenen Untersuchungen in Vorversuche und Besamungsversuche empfiehlt es sich, die Ergebnisse der Vorversuche unter Heranziehung der in der Literatur enthaltenen Mitteilungen schon vor dem Abschnitt der Arbeit, in dem die Ergebnisse der Besamungsversuche enthalten sind, ausführlich zu diskutieren.

II. Vorversuche zu den einzelnen Verdünnerbestandteilen und zum Verdünnungsmodus.

1. Milch als Verdünnungsbestandteil.

Auf Experimente mit frischer Magermilch wurde verzichtet, da sich bei der Verwendung von Magermilchpulver viele Vorteile ergeben, aber hinsichtlich der Konzeptionsrate keine Unterschiede zwischen beiden Milchformen bestehen sollen (MELROSE u. Mitarbeiter, 1958). Frische Magermilch ist aufgrund der kleinen Einzugsgebiete der ländlichen Meiereien bezüglich ihrer Zusammensetzung naturbedingten Schwankungen unterworfen, die sich nachteilig auf die Konservierungseigenschaften der Milch auswirken.

Auch bei Verwendung von Dosenmilch können Schwierigkeiten auftreten, die wie JAQUET und CASSOU (1952) berichten, zu überraschend schlechten Besamungsergebnissen führen. Bei 989 Besamungen mit Samen, verdünnt mit Eidotter-Zitrat, lag der Befruchtungserfolg bei 72 %. Das vergleichsweise bei der Besamung von 1429 Kühen erzielte schlechte Ergebnis von 48,6 % Umrinderern bei der Verwendung von Dosenmilch als Verdünnungsflüssigkeit führen die Autoren auf eine durch mangelhaften Dosenverschluß verursachte Veränderung der Milch zurück.

Versuch Nr. 1.

Bei dem großen Angebot von Trockenmilch verschiedener Hersteller war es notwendig, einige Sorten Magermilchpulver auf ihre Spermaverträglichkeit zu prüfen. Es standen Produkte von 6 Firmen aus dem Raum Schleswig-Holstein zur Verfügung (Hansa-Meierei, Lübeck; Kieler Meierei; Milchwerke Wöhrmann, Loose; Milchzentrale Lütjenburg; Meierei-Genossenschaft Kaltenkirchen; Deutsche Nestle-A.G.). Von jeder Firma wurde ein nach dem Sprühverfahren hergestelltes Magermilchpulver geprüft. Von der Firma Wöhrmann, Loose, stand außerdem ein Walzmagermilchpulver zur Verfügung.

Sprühmagermilch wird nach folgendem Verfahren hergestellt:

Nach dem Entrahmen der Rohmilch wird die Magermilch im Kurzzeiterhitzungsverfahren aufbereitet. In einer dreistufigen Fallstromverdampferanlage wird die Magermilch in einem Verhältnis von 1 : 4,75 (diese Zahlenangabe schwankt bei Angaben einzelner Werke) evaporiert und anschließend im Sprühverfahren zu Magermilchpulver verarbeitet. Beim Walzmagermilchpulver ändert sich nur der letzte Teil des Verfahrens. Die Milch wird hier nicht im Sprühturm getrocknet, sondern auf rotierenden, von innen beheizten Walzen.

Im Versuch wurden von den oben aufgeführten Magermilchfabrikaten je 9 Gramm Magermilchpulver in 91 ccm (g/V) Aqua dest. gelöst. Vor der Verdünnung wurden diese 7 Milchlösungen in einem Wasserbad für 10 Minuten auf ca. 93°C erhitzt. Zu den einzelnen Verdünnern kamen nach erfolgter Abkühlung je 8 Volumen-Prozent Glycerin. Als keimhemmender Zusatz wurde die "Antibiotika-Schere" verwendet. Nach der Teilung der Ejakulate in 7 Fraktionen zu je 0,8 ccm wurden jeder Samenfraktion mit einer Pipette 10 ccm Milchlösung zugefügt. Das Verdünnungsverhältnis lag in allen 7 Einzelversuchen gleichmäßig bei 1 : 12. Die verdünnten Samendosen wurden zur Feststellung des Anhaltens der Vorwärtsbewegung und der äußersten Lebensdauer alle zwei Tage einer mikroskopischen Prüfung unterzogen.

Bulle Nr. 40; Samenmenge 6,0 ccm; Dichte 1,8 Mill/ccm; pH-Wert 6,8; Massenbewegung +++; Vorwärtsbewegung in % = 85

Tage nach Verdünnung	I V %	II V %	III V %	IV V %	V V %	VI V %	VII V %
1.	80	80	80	85	85	85	75
3.	70	65	75	80	80	75	80
5.	60	40	70	70	75	70	55
7.	55	20	55	65	70	65	40
9.	45	5	30	35	55	60	30
11.	35	0	10	50	55	55	20
13.	30	0	5	40	50	45	10
15.	20	0	0	30	40	35	0
17.	15	0	0	20	35	25	0
19.	5	0	0	15	25	15	0
21.	0	0	0	10	20	10	0
23.	0	0	0	0	15	5	0
25.	0	0	0	0	5	0	0
26.	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle I: Einfluß verschiedener Trockenmagermilchsorten auf die Vorwärtsbewegung und die äußerste Lebensdauer der Spermien.

In den Spalten I und III bis VII sind die Ergebnisse der Verwendung von Sprühmagermilchpulver und in Spalte II die von Walzmagermilchpulver der angeführten Hersteller aufgeführt.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß das Anhalten und die Intensität der Vorwärtsbewegung der Spermien bei den im Versuch eingesetzten Milchsorten unterschiedlich waren. Am wenigsten eignete sich Walzmagermilchpulver (Spalte II) für einen Spermaverdünner. Bei der Herstellung des Walzmagermilchpulvers wird nach PRACHOFF (1958) die kolloidale

Zusammensetzung der Milch verändert. Auch EIBL (1959) empfiehlt, der Sprühmilch den Vorzug zu geben. Da heute fast alle Trockenmilch herstellenden Betriebe nach diesem Prinzip arbeiten, bestehen bei der Beschaffung des Sprühmagermilchpulvers keine Schwierigkeiten. Wie die Tabelle weiterhin zeigt, bestehen auch unter den nach dem Sprühverfahren hergestellten Milchen erhebliche Unterschiede in der Spermafreundlichkeit. Obwohl mit der in Spalte V verzeichneten Sprühmilch das beste Ergebnis erzielt wurde, mußte auf ihre Anwendung aus hygienischen Gründen verzichtet werden, da sie als lose Abpackung in Perlontüten geliefert wird. Für die Besamungsversuche wurde ausschließlich die an zweiter Stelle liegende Trockenmagermilch "Molico" (Spalte VI) verwandt.

" Molico", ein Produkt der Deutschen A.G. für Nestle-Erzeugnisse, Lindau/Bodensee, ist eine Sprühmilch, die infolge eines besonderen Herstellungsverfahrens auch in kaltem Wasser gut löslich ist. Entsprechende Temperaturen während des Produktionsganges und die sterile Verpackung in Do-sen garantieren weitgehende Keimarmut.

Ein Lösungsverhältnis von 9 g Magermilchpulver, in diesem Fall "Molico", auf 91 ccm Aqua dest. entspricht den Anforderungen als Konservierungsmittel am besten (EIBL, 1959).

Nach SENEGACNIK (1960) ist eine 9 %ige (g/V) Lösung von Magermilchpulver isotonisch mit dem Samenplasma.

Aus vielen Hinweisen in der Literatur der letzten Jahre ist ersichtlich, daß zur Zerstörung des spermafeindlichen Faktors Lactenin die Milch vor ihrer Verwendung als Samenkonservierungsmittel für eine Zeit von 10 Min. auf 93 bis 95°C erhitzt werden muß (DREHER und WEBB, 1953, FLECHINGER u. Mitarbeiter, 1953, FLIPSE u. Mitarbeiter, 1954, THACKER u. Mitarbeiter, 1954, RIEDL, 1958, MELROSE u. Mitarbeiter, 1958, ALBRIGHT u, Mitarbeiter, 1958, ALMQUIST, 1959, EIBL, 1959).

Lactenin, eine Substanz der Milch, die gegen Streptokokken gerichtet ist, wurde von FLIPSE u. Mitarbeitern (1954) aus Azetonfraktionen der Molke konzentriert gewonnen. Es zeigte sich, daß diese Substanz sehr toxisch auf Rindersperma wirkt. Nach Ansicht von THACKER u. Mitarbeitern (1954) ist Lactenin an die albuminhaltigen Bestandteile des Milchproteins gebunden. Lactenin wird durch Sulphydrilgruppen, die beim gleichmäßigen Erhitzen der Milch - für einige Minuten auf 93 bis 95°C - frei werden, irreversibel gehemmt (EIBL, 1959). Diese Erhitzung geschieht am besten in einem Wasserbad.

Die Annahme, daß das Lactenin schon durch die hohen Temperaturen, die bei der Herstellung des Milchpulvers herrschen, zerstört wird, erwies sich aufgrund der durchgeführten Versuche als unwahrscheinlich. Bei Feststellung der äußersten Lebensdauer der Spermien zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Samenproben, die in erhitzter und unerhitzter Milch konserviert wurden.

Versuch Nr. 2.

Für diese Versuche standen die Ejakulate von 5 Bullen zur Verfügung. Die Ejakulate wurden in zwei gleiche Teile geteilt. Während jeweils ein Teil des Samens mit unerhitzter Milch verdünnt wurde, wurde der Milchverdünner für den anderen Teil des Ejakulates im Wasserbad für 10 Minuten auf ca. 93°C erhitzt. Das Verdünnungsverhältnis der einzelnen Ejakulate lag zwischen 1 : 5 bis 1 : 12. "Antibiotika-Schere" wurde nach den bekannten Richtlinien hinzugefügt. Die so verdünnten Samenproben wurden auf das Anhalten der Vorwärtsbewegung und auf die äußerste Lebensdauer der Spermien alle zwei Tage mikroskopisch geprüft.

Bulle:	36	37	40	41	42		36	37	40	41	42	
Dichte Mill/cmm	0,6	1,3	1,1	1,3	1,0		0,6	1,3	1,1	1,3	1,0	
pH-Wert	6,6	6,8	6,8	6,8	6,8		6,6	6,8	6,8	6,8	6,8	
Massenbewegung	+)+	++)+	++)+	+++	+++		+)+	++)+	++)+	+++	+++	
Vorwärtsbewegung	60	75	90	95	85		60	75	90	95	85	
	erhitzte Milch					ø	nicht erhitzte Milch					ø
Tage nach der Verdünnung	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %
1.	50	70	80	85	80	73	50	70	80	85	80	73
3.	40	70	75	80	80	69	25	65	75	80	75	64
5.	25	65	70-75	75	75	63	5	60	70	70	70	55
7.	10	55	70	70	65	54	0	45	60	65	60	46
9.	5	45	60	65	60	47	0	30	50	55	50	37
11.	0	40	50	55	50	30	0	15	35	40	35	25
13.	0	25	40	45	40	30	0	5	25	25	20	15
15.	0	15	25	30	25	19	0	0	0	15	10	6
17.	0	5	15	15	15	10	0	0	0	5	5	2
19.	0	0	5	10	10	5	0	0	0	0	0	0
21.	0	0	0	5	5	2	0	0	0	0	0	0
23.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle II: Anhalten der Vorwärtsbewegung und der äußersten Lebensdauer der Spermien bei Verdünnung der Ejakulate von 5 Bullen in erhitzter und nicht erhitzter Trockenmagermilch "Molico" (ø = Durchschnittswerte)

Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien war in erhitzter Milch bis zum 3. Tag nach der Verdünnung mit Ausnahme eines Bullen (Nr. 36) nur geringfügig besser als in unerhitzter Milch. Bis zum 7. Tage nach der Verdünnung war dann ein etwas stärkerer Abfall der Vorwärtsbewegung bei den Spermien beobachtet worden, die in unerhitzter Milch konserviert wurden. Da auch die äußerste Lebensdauer der Spermien in erhitzter Milch um 4 Tage länger als in unerhitzter Milch war, erscheint es zweckmäßig, die zur Samenkonservierung benötigte Milch zu erhitzen.

2. Wasser als Verdünnerbestandteil.

Bei der Herstellung eines Verdünners aus Trockenmagermilch muß besonderer Wert auf die Beschaffenheit des Wassers gelegt werden, in dem das Magermilchpulver aufgelöst wird.
Brunnen- und Leitungswasser können einen wechselnden Gehalt an gelösten Salzen haben. Die sich daraus ergebenden Schwankungen in der Ionen-Konzentration des Verdünners sind nicht tragbar. Das zu verwendende destillierte Wasser muß über Glas destilliert sein. Über Kupfer destilliertes Wasser hat einen erhöhten Gehalt an Elektrolyten. Im Versuch wurde über Quarzglas einfach destilliertes Wasser benutzt. Veränderungen des destillierten Wassers können in Vorratsgefäßen auftreten, da aus gewöhnlichem Glas Alkalien durch das Wasser herausgelöst werden. Eine zweite Veränderung des destillierten Wassers kann durch Kohlensäure bedingt sein, die bei und nach der Kondensation sehr rasch aus der Luft aufgenommen wird und dem Wasser eine schwachsaure Reaktion verleiht, die ebenfalls eine Schädigung des Samens bei der Lagerung veranlassen kann. Man kann die saure Reaktion vermeiden, wenn das Wasser sofort nach der Destillation oder nach dem Aufkochen in fest verschlossenen Gefäßen aufbewahrt wird (GSTIRNER, 1959).

3. Erhöhung der Viskosität des Magermilch-Glycerin-Verdünners durch Einbau von Gelatine.

Bei den ersten Versuchen mit Magermilch-Glycerin-Verdünner wurde bei Aufbewahrung des verdünnten Samens im Kühlraum nach einigen Stunden ein Absinken der Spermien im Samengläschen beobachtet. Die Spermien konzentrieren sich dabei auf einen engbegrenzten Raum und sind den schädigenden Einflüssen ihrer eigenen Stoffwechselprodukte - in der Hauptsache Milchsäure - in erhöhtem Maße ausgesetzt. Es werden dadurch ungünstige Bedingungen für die Samenkonservierung geschaffen. Die Lebensdauer der Spermien verkürzt sich.

Um der Sedimentierung der Spermien im Verdünner entgegenwirken zu können, wurden Versuche unternommen, in den Verdünner Gelatine einzubauen. Gelatine wird aus dem Gerüsteiweißkörper Collagen gewonnen. Collagen geht beim Behandeln mit siedendem Wasser oder erhitztem Dampf in ein lösliches Protein, die Gelatine, über (LEUTHARDT, 1959). Gelatine ist also organisches Material. Ihre Beschaffenheit ist abhängig von den inkonstanten Baustoffen des Ausgangsproduktes Collagen und damit Qualitätsschwankungen unterworfen.

Versuch Nr. 3.

Bei der Suche nach einer geeigneten Gelatineart wurden Gelatine in Blattform und gekörnte Gelatine für bakteriologische Zwecke geprüft. Die notwendige Zerkleinerung der Gelatineblätter konnte nicht immer zufriedenstellend erreicht werden. Hinzu kommt eine in mehreren Fällen beobachtete unvollkommene Auflösung der Gelatine im Magermilch-Glycerin-Verdünner, die bei der gekörnten Gelatineform nicht festgestellt werden konnte. Die gekörnte Gelatine für bakteriologische Zwecke bietet sich auch aufgrund ihrer hygienischen Verpackung zur Verwendung als Verdünnerzusatz an.

Die Gelatine wurde nach kurzem Quellen in Aqua dest. für einige Minuten auf ca. 95°C erhitzt. Durch die Erhitzung des Gelatinewassers findet ein Abbau des löslichen Proteins Gelatine statt, durch den die Viskosität im Verdünner sinkt.

Bei weiteren eigenen Untersuchungen stellte es sich heraus, daß ein Gelatinezusatz von 0,35 % pro 100 ccm (g/V) Magermilch-Glycerin-Verdünner das Sedimentieren der Spermien im verdünnten Samen mit einiger Sicherheit zu verhindern vermag. Versuche mit 0,4 %, 0,45 % und 0,5 % Gelatine pro 100 ccm (g/V) Verdünner ergaben bei Kühlschranktemperaturen von +4 bis +5°C eine zu starke Eindickung des Verdünners. Dadurch werden bei der Entnahme des verdünnten Samens aus den Einportionsgläschen Schwierigkeiten verursacht. Bei der Samenübertragung bleibt außerdem ein nicht geringer Teil des Samens in der Besamungspipette zurück. Angeregt durch den Hinweis von EIBL und Mitarbeitern (1960), daß Gelatine bei Anwendung zu hoher Dosen eine spermizide Wirkung haben kann, wurde versucht die Gelatinekonzentration im Magermilch-Glycerin-Verdünner so niedrig als irgend möglich zu halten. Es stellte sich aber heraus, daß bei Verwendung einer geringeren Menge Gelatine als 0,35 % pro 100 ccm (g/V) Verdünner die Gelatine nicht mehr ihrem Zweck gerecht wird, durch Erhöhung der Viskosität im Verdünner die Spermien in ihrer Beweglichkeit einzuschränken und die Sedimentierung zu erschweren.

4. Glycerin als Verdünnerzusatz.

Versuch Nr. 4.

Zur Klärung der Frage, ob die Beschaffenheit verschiedener Glycerinsorten auf das Konservierungsergebnis des Magermilch-Glycerin-verdünnten Samens Einfluß nehmen kann, wurden folgende drei Glycerinfabrikate einer Prüfung unterzogen:

1. Glycerinum bidestillatum puriss.
   30^{0} Be = 1,26 der Fa. MERCK A.G., Darmstadt

2. doppelt destilliertes Glycerin D_{20}
   1,221 - 1,231 DAB_6 der Fa. RIEDEL DE HAEN A.G.,
   Seelze, Hannover

3. Glycerin DAB_6 aus einer Apotheke.

Die Versuche wurden mit je einem 3-geteilten Ejakulat von drei Bullen ausgeführt. Der Glycerinzusatz zum Magermilch-Verdünner betrug jeweils 10 Volumenprozent der genannten Glycerinarten. Durch die Dreiteilung der Ejakulate war es möglich, alle Glycerinsorten an jedem Ejakulat zu prüfen. Sowohl die Vorverdünnung mit einem glycerinfreien Verdünneranteil, als auch die Endverdünnung mit der glycerinhaltigen Verdünnerfraktion wurden bei Zimmertemperaturen durchgeführt. Die Endverdünnung geschah in steigenden Fraktionen in 10-minütigen Abständen. Das Verdünnungsverhältnis lag bei allen drei Ejakulaten einheitlich bei 1 : 7. Die Auswertung dieser Versuche erfolgte ebenfalls anhand der Beurteilung des Anhaltens der Vorwärtsbewegung und der äußersten Lebensdauer der Spermien.

Bulle:	34	35	37	34	35	37	34	35	37
Dichte Mill/cmm	1,2	1,6	1,3	1,2	1,6	1,3	1,2	1,6	1,3
pH-Wert	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Massenbewegung	+++	+++	++)+	+++	+++	++)+	+++	+++	++)+
Vorwärtsbewegung	.80	85	75	80	85	75	80	85	75
	Glycerin Fa. MERCK			Glycerin Fa. RIEDEL DE HAEN			Glycerin DAB_6		
Tage nach der Verdünnung	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %	V %
1.	75	80	65	75	80	65	75	80	65
3.	70	75	60	70	70	60	65	70	55
5.	65	65	55	65	65	55	50	55	45
7.	55	60	45	55	65	45	40	40	30
9.	50	55	30	50	50	35	25	25	10
11.	40	45	20	45	45	20	10	10	0
13.	30	35	10	30	35	10	5	5	0
15.	20	20	5	20	20	5	0	0	0
17.	10	10	0	10	10	0	0	0	0
19.	5	5	0	5	5	0	0	0	0
21.	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle III: Der Einfluß verschiedener Glycerinfabrikate auf das Anhalten der Vorwärtsbewegung und der äußersten Lebensdauer der Spermien im Magermilch-Glycerin-verdünnten Samen von 3 Bullen.

Die Glycerinsorten der Firma MERCK A.G., Darmstadt, und der Firma RIEDEL DE HAEN, Seelze, Hannover, sind bis auf geringfügige Abweichungen, die aber an subjektiven Fehlern bei der mirkroskopischen Betrachtung liegen können, als gleichwertig einzuschätzen. Das Apotheker-Glycerin nach DAB_6 entspricht nicht den gestellten Anforderungen. Da es sich hierbei um ein in der Apotheke in Flaschen abgefülltes Material handelt, kann die Ursache in einer Verunreinigung des Glycerins gesucht werden.

Während Glycerin DAB_6 13 bis 16 % Wasser enthalten darf, ist Glycerin pro analysi wasserfrei.

Nach der Hypothese von DE GROOT (1956), nach der das Glycerein infolge seiner starken hygroskopischen Kraft den Samenzellen das "freie Wasser" entzieht und an dessen Stelle ins Zellprotoplasma tritt, müßte der Glycerinverbrauch je nach Wassergehalt des Gylcerins und der Spermienkonzentration im Verdünner steigen oder fallen.

EIBL (1959) empfiehlt reinstes, wasserfreies Glycerin als Verdünnerzusatz.

DEMINATUS (1956) fand bei der Verwendung des Glycerins für das Sperma-Tiefkühlverfahren den Unterschied zwischen einem Glycerin nach DAB_6 und einem Analysen-Glycerin unerheblich. Der Gehalt an chemischen Beimengungen - Analysenglycerin soll z.B. nicht über 0,002 % Schwermetallionen enthalten - ist bei beiden genannten Glycerinarten beinahe gleich hoch (DEMINATUS, 1956).

Für die praktische Anwendung empfiehlt es sich, im Interesse einer leichteren Arbeit, ein möglichst dünnflüssiges Glycerin zu wählen. Es ist anzuraten, stets Originalabfüllungen zu verwenden, da bei diesen eine Reinheit des Glycerins vorausgesetzt werden kann.

Von entscheidender Bedeutung für das Ergebnis der Spermakonservierung ist die Anwendung der optimalen G l y c e r i n - K o n z e n t r a t i o n. Über dieses Problem ist bei der Entwicklung des Samentiefkühlverfahrens

außerordentlich viel gearbeitet worden, ohne aber dabei zu einer Übereinstimmung zu gelangen. Die Angaben der einzelnen Autoren über die optimalen Glycerin-Konzentrationen im Tiefgefrier-Verdünner schwanken zwischen 5 und 15 %.

Ebenso finden sich über die beim Magermilch-Glycerin-Verdünner - Aufbewahrung des verdünnten Samens bei +3 bis +5°C - anzuwendenden Glycerin-Konzentrationen in der Literatur abweichende Hinweise: MC LEAN (1956), O'CONNOR und SMITH (1959) und ALMQUIST (1959) arbeiten mit einer Konzentration von 10 % Glycerin. SIKES und MERILAN (1958) dagegen empfehlen 8 % Glycerin.

Versuch Nr. 5.

Zur Orientierung über die zuträglichste Glycerin-Konzentration wurden Versuche mit steigendem Glyceringehalt im Magermilch-Glycerin-Verdünner unternommen. An zwei in drei Proben aufgeteilten Ejakulaten von zwei Bullen wurden Konzentrationen von 5 %, 10 % und 15 % Glycerin und an einem weiteren, ebenfalls geteilten, Ejakulat Konzentrationen von 6 %, 8 %, 10 % und 12 % Glycerin geprüft. Das Verdünnungsverhältnis lag, abhängig von der Größe der einzelnen Ejakulate, zwischen 1 : 5 und 1 : 11.

Der Verdünnungsmodus und die Auswertung des Versuches wurden wie in dem vorangegangenen Versuch gehandhabt.

Bulle:	15	19	15	19	15	19
Dichte Mill/cmm	1,6	1,2	1,6	1,2	1,6	1,2
pH-Wert	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
Massenbewegung	++	+++	++	+++	++	+++
Vorwärtsbewegung	75	85	75	85	75	85
	Glycerin-Konzentration					
Tage nach der Verdünnung	5 % V %		10 % V %		15 % V %	
1.	70	85	70	85	70	85
3.	55	80	65	80	55	75
5.	45	70	55	75	40	65
7.	25	55	45	65	20	50
9.	10	45	25	60	5	30
11.	5	30	15	50	0	15
13.	0	10	10	40	0	5
15.	0	0	5	25	0	0
17.	0	0	0	15	0	0
19.	0	0	0	5	0	0
21.	0	0	0	0	0	0

Tabelle Nr. IV: Der Einfluß einer 5-, 10- und 15prozentigen Glycerin-Konzentration im Magermilch-Glycerin-Verdünner auf das Anhalten der Vorwärtsbewegung und der äußersten Lebensdauer der Spermien von 2 Bullen.

Aufgrund der Beurteilung der Vorwärtsbewegung der Spermien wird deutlich, daß sich eine Konzentration von 15 % Glycerin nicht günstig auf den verdünnten Samen auswirkt. Die äußerste Lebensdauer der Spermien wird in der 10 %igen Glycerin-Konzentration länger erhalten als in den beiden anderen Konzentrationen. Aus diesem Versuch geht nicht hervor, ob die optimale Glycerin-Konzentration bei 10 % oder zwischen 5 und 10 % oder zwischen 10 und 15 % liegt.

Zur weiteren Klärung dieser Frage sollte die Erprobung eines 6-, 8-, 10- und 12 %igen Glycerinzusatzes zum Magermilch-Verdünner im zweiten Teil dieses Versuches dienen.

Bulle Nr. 27: Dichte 1,2 Mill/cmm; pH-Wert 6,8; Massenbewegung ++)+; Vorwärtsbewegung 80

Tage nach der Verdünnung	Glycerin-Konzentration 6 % V %	8 % V %	10 % V %	12 % V %
1.	70	75	70	70
3.	65	70	65	60
5.	50	60	50	45
7.	35	45	40	30
9.	30	35	30	20
11.	15	20	20	10
13.	5	10	5-10	0
15.	0	5	0	0
17.	0	0	0	0

Tabelle Nr. V: Einwirkung einer 6-, 8-, 10- und 12 %igen Glycerin-Konzentration im Magermilch-Verdünner auf Vorwärtsbewegung und äußerste Lebensdauer der Spermien eines aufgeteilten Ejakulates eines Bullen.

Die Ergebnisse des letzten Versuches (Tab. V) lassen erkennen, daß mit einem 8 %igen Glycerinzusatz zum Magermilch-Verdünner die Beweglichkeit und die äußerste Lebens-

dauer der Spermien am intensivsten bzw. längsten erhalten bleiben. Diese Feststellung steht m. o. w. in Übereinstimmung mit den Erfahrungen, die sowohl in der Zentralbesamungsstation Schönböken, als auch an anderen Stellen über den optimalen Glycerinzusatz zum Tiefkühl-Verdünner gemacht wurden. Als optimale Glycerinzugaben wurden auch für diesen Verdünner Konzentrationen zwischen 6 und 10 % ermittelt, wobei die 6 %ige ungünstiger als die 10 %ige ist (DEMINATUS, 1956). SCHURIAN (1958) verwendet 10 % und TIMM (1959) 8 - 11 % Glycerin bei der Herstellung des Tiefkühlverdünners.

Die Angaben von MILLER und VAN DEMARK (1954), wonach bei einem Natriumzitrat-Puffer als Grundverdünner für das Tiefgefrierverfahren Glycerin-Konzentrationen bis zu 30 % ohne Spermaschäden vertragen werden, können für den Milch-Glycerin-Verdünner für Kühlschranktemperatur nicht bestätigt werden. Hinzu kommt die offensichtlich vorhandene unterschiedliche Glycerinverträglichkeit einzelner Ejakulate, auf die aber aus technisch-praktischen Gründen - die Versuche wurden während der Hauptbesamungszeit durchgeführt - nicht näher eingegangen werden konnte.

Bei zu hohen Glycerin-Konzentrationen, verbunden mit einer zu raschen, unzweckmäßigen oder nicht fraktionierten Glycerinzugabe zeigt das mikroskopische Bild eine große Anzahl von osmotisch geschädigten Samenzellen, die ungeordnete Kreisbewegungen ausführen. Inwieweit Spermien, die unmittelbar nach dem Glycerinzusatz Kreisbewegungen erkennen lassen, für den Befruchtungsvorgang ausfallen, ist nicht bekannt. Es war mehrfach zu beobachten, daß bei Untersuchung dieser Verdünnungen zu einem späteren Zeitpunkt pathologische Bewegungsformen nicht mehr festgestellt werden konnten. Die unphysiologischen Spermienbewegungen nach dem Glycerinzusatz sind nach DE GROOT (1956) hauptsächlich bei nicht voll ausgereiften Spermien anzutreffen, an deren Mittelstück sich ein Distaltropfen befindet. Das

Glycerin kann dort nicht so schnell in das Protoplasma eindringen. Durch das unterschiedliche osmotische Gefälle - Glycerin entzieht dem Zelleiweiß Wasser - schrumpft das Protoplasma ungleichmäßig zusammen. Das Mittelstück wird einseitig verformt. Die daraus resultierenden, mechanisch wirksamen Spannungen führen dazu, daß das Mittelstück umschlägt. Das Spermium verliert seine gradlinige Form, und die Bewegung wird unphysiologisch. Aufgrund offensichtlich individueller Voraussetzungen in den Ejakulaten verschiedener Bullen treten diese beschriebenen Glycerineinwirkungen an den Spermien von Bulle zu Bulle, ja von Ejakulat zu Ejakulat, unterschiedlich auf.

Zu den von DE GROOT (1956) angesprochenen Ursachen kommen aber nach eigenen Feststellungen noch andere Faktoren. Bei zu hoher Glycerin-Konzentration und zu schneller Glycerinzugabe ist auch bei Spermien, die voll ausgereift sind, mit vielen Rückwärts- und Kreisläufen zu rechnen. Diese Beobachtung wurde mehrmals gemacht, wenn zuerst der glycerinhaltige Verdünneranteil versehentlich anstelle des glycerinfreien Verdünneranteils dem Ejakulat zugegeben wurde.

Gestützt auf die mikroskopischen, morphologischen und Beweglichkeits-Untersuchungen wird in Schönböken mit 8 ccm Glycerin auf 92 ccm Milch gearbeitet. Das entspricht einem Verhältnis von ca. 8 Gewichtsprozenten Magermilchpulver zu 8 Volumenprozenten Glycerin.

Bei Studien dieser Verhältnisse für das Tiefgefrierverfahren kamen AMANN und ALMQUIST (1957) zu gleichen Ergebnissen. Sie stellten fest, daß der für die optimale Gefrierfähigkeit des Samens erforderliche Glycerinzusatz zu den Trockenbestandteilen der Milch in Beziehung steht. Die besten Überlebensraten beim Wiederauftauen des Samens erreichten sie, wenn der Prozentsatz des Milchpulvers (in Gewichtsprozenten) mit dem Glycerin (in Volumenprozenten) übereinstimmte.

Es ist aber zu bedenken, daß bei einer Samenaufbewahrung bei -79°C andere Voraussetzungen vorliegen als bei Aufbewahrung des Samens bei +3 bis +5°C. Beim Tiefgefrierverfahren kann durch das Einhalten einer Aequilibrierungszeit vor dem Teifgefrieren das Eindringen des Glycerins in die Spermien gesteuert werden. Diese Möglichkeit entfällt bei einer Samenaufbewahrung bei Kühlschranktemperatur. Inwieweit aber diese Tatsachen einen Einfluß auf die Spermakonservierung bei Kühlschranktemperatur nehmen, ist nicht zu beantworten, da noch nicht klar ist, ob die Spermien während der ganzen Dauer der Konservierung Glycerin aufnehmen oder ob zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Glycerinsättigung der Spermien eintritt.

Aufgrund der individuell unterschiedlichen Eignung der Ejakulate zur Glycerinierung wäre es erstrebenswert, für jeden Bullen eine optimale Glycerin-Konzentration zu finden. Da aber angenommen werden muß, daß sich die Glycerinverträglichkeit der Ejakulate eines Bullen über kurze oder lange Zeiträume ändert - unter anderem bedingt durch Einflüsse der Haltung, der Fütterung, des Lebensalters usw. - wird auch eine einmal individuell gefundene optimale Glycerinquantität nicht immer zuträglich sein. Um diese Variationen berücksichtigen zu können, wäre es notwendig, jedes Ejakulat eines jeden Bullen zu untersuchen, um festzustellen, welche Menge Glycerin, bezogen auf die Spermiendichte, die optimalen Konservierungsbedingungen ergeben würde. Abgesehen von der Frage, ob eine geeignete Routinemethode entwickelt werden kann, wird die Einführung dieses Verfahrens wegen des großen Arbeitsaufwandes auf technische Schwierigkeiten stoßen.

5. Herstellung des Magermilch-Glycerin-Verdünners.

Aufgrund der bisher beschriebenen Vorversuche wird seit dem 7. Januar 1960 im Bereich der Zentralbesamungsstation Schönböken mit einem Verdünner gearbeitet, der auf folgende Weise hergestellt wird:

a.) In 100 ccm über Quarzglas destilliertem Wasser läßt man 0,35 g Gelatine (für bakteriologische Zwecke gekörnt) kurze Zeit quellen. Danach Erhitzung des Gelatinewassers für einige Minuten auf ca. 95°C.

b.) Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird eine Lösung von 9 g "Molico" in 91 ccm Gelatinewasser hergestellt und anschließend für 10 Minuten in einem Wasserbad bei einer gleichbleibenden Temperatur von 92 bis 93°C gehalten. Als antibiotischer Schutz wird, nachdem die Milch auf Zimmertemperatur abgekühlt ist, die "Antibiotika-Schere" der Fa. MACK, Illertissen, zugesetzt.

c.) Nach Halbierung der Gesamtmenge des Magermilch-Glycerin-Verdünners kommt zu der einen Hälfte (46 ccm) ein Anteil von 16 ccm Glycerin. Besonders gut geeignet ist die dünnflüssige Glycerinsorte der Fa. RIEDEL DE HAEN - doppelt destilliertes Glycerin D_{20} 1,221-1,231 DAB_6 -.

6. Verdünnungs-Modus.

ALMQUIST (1959) verdünnt mit dem glycerinfreien Anteil des Magermilch-Verdünners bei Zimmertemperatur. Der glycerinhaltige Anteil wird erst dann dem vorverdünnten Samen fraktioniert hinzugefügt, wenn beide Teile auf eine Temperatur von +4°C heruntergekühlt sind.

HOLT (1953) stellte bei Arbeiten für das Tiefgefrierverfahren fest, daß es für den Wiederbelebungsgrad der Spermien nicht von Bedeutung ist, ob der Glycerinzusatz bei Zimmertemperatur oder aber erst sechs Stunden später bei Kühlschranktemperatur vorgenommen wird.

Um nach dem von ALMQUIST (1959) vorgeschlagenen Prinzip arbeiten zu können, ist für größere Stationen ein geräumiger Kühlraum unbedingt erforderlich. Da aber viele kleine Stationen nicht über genügend große Kühlvorrichtungen verfügen, sind die Vorteile, die sich aus der Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners ergeben, für

diese Stationen nicht realisierbar. Aber auch für größere Stationen ist der Arbeitsaufwand bei diesem Verfahren sehr groß.

In der Zentralbesamungsstation Schönböken müssen in Spitzenzeiten täglich die Ejakulate von 15 Bullen zu etwa 1000 Besamungsportionen verarbeitet und in Einportionsgläschen abgefüllt werden. Durch eine sechsstündige Vorkühlzeit und die sich anschließende Arbeitszeit für den fraktionierten Glycerinzusatz könnte der Samen bei diesem zeitraubenden Arbeitsverfahren erst 12 Stunden später zum Versand bzw. zur Anwendung kommen. Hinzu käme die Notwendigkeit eines Umbaues des Kühlraumes, um Arbeitsplätze für mindestens zwei Personen zu schaffen.

Ermutigt durch gute Erfahrungen von SCHRÖDER (1959) und einige Untersuchungen, deren Ergebnisse später in anderem Zusammenhang tabellarisch aufgeführt sind, und in Anbetracht der geschilderten technischen Schwierigkeiten, wurde daher das von ALMQUIST vorgeschlagene Verfahren derart modifiziert, daß für den Routinebetrieb beide Verdünnungsvorgänge bei Zimmertemperatur durchgeführt und das Sperma auch bei dieser Temperatur abgefüllt wurde.

Von der Samenentnahme bis zur Abfüllung wird jedes Ejakulat von einem Kontrollzettel begleitet, auf dem alle wichtigen Daten, wie Name des Bullen, Vorgänge der Samenaufbereitung, mikroskopische Nachuntersuchung des verdünnten Samens usw., eingetragen werden.

Kontrollzettel für die Spermaaufbereitung mit Magermilch-Glycerin-Verdünner

Bulle	Uhrzeit	Menge	Dichte	pH-Wert	Masse	V.	Ges.Verd.
6	14^{00}	6,0	1,1	6,8	+++	90	70

1. Verdünnung			2. Verdünnung		
Uhrzeit	Menge		Uhrzeit	Menge	Z.
14.10	35 ccm	1. 0	14.20	3 ccm	Zeichen des Ausführenden
		2. 0+10	14.30	7 ccm	
		3. 0+20	14.40	10 ccm	
		4. 0+30	14.50	15 ccm	
Unters. = V 85		Sa.		35 ccm	

Im einzelnen laufen die Arbeitsgänge wie folgt ab:

Nach der Bestimmung der Samendichte mit dem Spermiodensimeter (nach KARRAS) und der Feststellung des pH-Wertes mit Indikatorpapier (MERCK A.G.) kommt der Samen in ein auf 25 bis 27°C temperiertes Wasserbad zur mikroskopischen Untersuchung. Der Verdünnungsgrad, abhängig vorwiegend von der Ejakulatsmenge sowie der Spermiendichte oder auch dem pH-Wert und der Qualität des Ejakulates, wird so eingestellt, daß in einem Kubikmillimeter verdünnten Samens mindestens 90 000 bis 100 000 Spermien vorhanden sind. Je nach Spermien-Konzentration und Ejakulatsgröße variieren die Endverdünnungen zwischen einem Verhältnis von 1 : 6 bis 1 : 20. Nach der mikroskopischen Untersuchung wird zunächst der gleichfalls auf 25 bis 27°C erwärmte glycerinfreie Verdünneranteil A dem Samen unter ständig mischenden Bewegungen mit der Pipette zügig zugesetzt.

Nach Abschluß der Vorverdünnung mit Verdünneranteil A erfolgt bei der gleichen Temperatur die Endverdünnung mit dem glycerinhaltigen Verdünneranteil B.

Versuche hatten ergeben, daß der Zusatz des glycerinhaltigen Verdünneranteils mit geringsten Spermaschädigungen zu erreichen ist, wenn der Verdünner B in vier Fraktionen zugegeben wird. Weiterhin zeigte es sich, daß es zweckmäßig ist, die vier Fraktionen nicht in gleicher Volumengröße hinzuzugeben, sondern mit kleinen Volumina zu beginnen und dann von Fraktion zu Fraktion das Volumen zu steigern. Über die jeweiligen Größen der vier in 10minütigen Abständen zuzugebenden Fraktionen wurden für jedes in Frage kommende Gesamtvolumen des zuzusetzenden Verdünners B eine Erfahrungstabelle aufgestellt, in der die einzelnen Fratkionsgrößen festgelegt sind.

In der folgenden Übersicht ist ein Ausschnitt aus dieser Tabelle dargestellt:

Verdünneranteil	Fraktion	Zeitpunkt in Minuten	ccm					
Glycerinfreier Verdünner A	gesamt	0	10	15	20	25	30	35
	1.	0 + 10	1	2	3	3	3	3
Glycerinhaltiger	2.	0 + 20	2	3	5	5	7	7
Verdünner B	3.	0 + 30	3	5	5	7	10	10
	4.	0 + 40	4	5	7	10	10	15
Gesamtmenge des zugesetzten Verdünners B			10	15	20	25	30	35

Tabelle Nr. VI: Fraktionsgröße und Zeitpunkt für die Zugabe des glycerinhaltigen Verdünneranteiles B.

Im Folgenden sei ein Beispiel für den Ablauf der Gesamtverdünnung mit einem Verdünnerzusatz von 70 ccm (Verdünner A = 35 ccm + Verdünner B = 35 ccm) wiedergegeben, wie es auch in dem Muster des Verdünnerprotokolls auf Seite 47 enthalten ist. Zehn Minuten nach der Vorverdünnung mit 35 ccm glycerinfreier Milch (Anteil A) werden 3 ccm glycerinhaltiger Milch unter vorsichtigem Mischen mit einer Pipette hinzugefügt. In jeweils 10minütigen Abständen wird mit weiteren Fraktionen von 7 ccm, 10 ccm und 15 ccm die Verdünnung beendet. Der verdünnte Samen wird dann einer zweiten mikroskopischen Prüfung unterzogen. Anschließend wird der verdünnte Samen in Einportionsgläschen zu 1 ccm, die für jeden Bullen durch Namensaufdruck gekennzeichnet sind, abgefüllt. Mit dem Tagesstempel versehen, werden sie zur langsamen und gleichmäßigen Abkühlung - die Abkühlung dauert 1 bis 2 Stunden - in ein Schwammgummikissen gelagert und in den Kühlraum gebracht.

Nach DE GROOT (1956) bedingt ein 10 %iger Glycerinzusatz zum Verdünner eine Gefrierpunkterniedrigung des verdünnten Samens auf -2,8°C. Bei einer Endkonzentration von 8 Volumenprozent Glycerin im Verdünner wird die dadurch bedingte Gefrierpunkterniedrigung nicht den Senkungseffekt einer 10 %igen Glycerinkonzentration im Verdünner erreichen. Es ergibt sich aber die Möglichkeit, die Kühlschranktemperatur auf +3°C einzustelle. Hierdurch läßt sich der Stoffwechsel der Spermien in den Besamungsdosen herabsetzen und es ist eine bessere Hemmung des Keimwachstums im verdünnten Samen zu erwarten, als bei einer Aufbewahrungstemperatur von +5°C erzielt werden kann. Hinzu kommt, daß glycerinhaltiger Samen auch bei einem eventuellen Absinken der Kühlschranktemperatur in den 0°C-Bereich nicht sofort gefriert.

Die Verdünnung mit Spermasol-N, dessen Brauchbarkeit mit dem Milch-Glycerin-Verdünner verglichen werden soll, geschah nach den von der Herstellerfirma (MACK, Illertissen)

gegebenen Richtlinien. Aufgrund der praktischen Erfordernisse mußte der Verdünnungsgrad bei der Spermasol-Verdünnung ebenso wie bei der Milch-Glycerin-Verdünnung auf ca. 100 000 Spermien pro cmm festgesetzt werden. Somit ergaben sich, abhängig von der Größe des Ejakulates und der Dichte der Spermien, Verdünnungsverhältnisse von 1 : 6 bis 1 : 20. Damit wurde der in der Gebrauchsanweisung für den Verdünner Spermasol empfohlene optimale Verdünnungsgrad von 1 : 2 bis 1 : 6 weit überschritten.

7. Konservierungsergebnisse nach Verdünnung mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin.

Einige Ejakulate wurden aufgeteilt, vergleichsweise mit den beiden Verdünnern auf je 100 000 Spermien pro cmm verdünnt und das Konservierungsergebnis in vitro anhand der mikroskopischen Kontrolle der Vorwärtsbewegung (V) überprüft. Die Aufbewahrung der Samendosen geschah bei einer Kühlschranktemperatur von +4°C. Nebenher lief eine Kontrolle der Veränderungen des pH-Wertes in den Verdünnungen (pH-Meter, Type 150 A der Metrohm A.G., Herisau, Schweiz). Die pH-Messung verfolgte den Zweck evtl. auftretende Milchsäuerung rasch zu erkennen.

In den Vergleich wurden folgende Verdünner einbezogen:

1. Spermasol-N
2. Milch-Glycerin-Verdünner
   a.) Verdünner B bei +4°C
   b.) Verdünner B bei +25 bis 27°C

Da, wie bereits erwähnt, der Zusatz des glycerinhaltigen Verdünneranteils B bei einer Temperatur von +4°C arbeitstechnisch große Schwierigkeiten verursacht, wurde in diesem Versuch die Fragestellung einbezogen, ob der Zusatz des glycerinhaltigen Verdünneranteils bei einer Temperatur von +25 bis +27°C von den Spermien in gleicher Weise wie bei der Temperatur von +4°C vertragen wird.

Die Ergebnisse dieser Versuche, die lediglich an je einem Ejakulat von 2 Bullen durchgeführt werden konnten, sind in der folgenden Tabelle Nr. VII enthalten.

Bulle	Dichte der Spermien Mill/cmm	pH-Wert	Massenbewegung	Vorwärtsbewegung %
40	1,3	6,8	++)+	80
41	1,6	6,8	+++	85

Verdünner	Spermasol-N				Magermilch-Glycerin							
Verdünnungsmodus					Verdünnung B bei +4°C				Verdünnung B bei +25 bis +27°C			
Bulle	40	40	41	41	40	40	41	41	40	40	41	41
Tage	V %	pH	V %	pH	V %	pH	V %	pH	V %	pH	V %	pH
1.	75	6,8	80	6,7	75	6,7	80	6,6	75	6,7	80	6,6
3.	60	6,6	65	6,6	70	6,6	70	6,6	70	6,6	75	6,5
5.	45	6,5	50	6,5	60	6,55	65	6,5	60	6,5	65	6,5
7.	25	6,4	30	6,4	50	6,5	55	6,5	50	6,5	55	6,5
9.	5		10	6,4	40	6,5	45	6,5	40	6,5	40	6,5
11.	0		0		20	6,4	30	6,4	20	6,35	30	6,4
13.					5	6,35	25	6,4	5	6,3	25	6,4
15.					0	6,2	15	6,4	0	6,2	10	6,4
17.							5	6,3			5	6,3
18.							0	6,2			0	6,2

Tabelle Nr. VII: Vorwärtsbeweglichkeit und äußerste Lebensdauer der Spermien sowie pH-Werte von Sperma, das vergleichsweise in Spermasol-N und Magermilch-Glycerin-Verdünner (Verdünnung B bei +4°C und bei +25 bis +27°C) konserviert wurde.

Beide Versuche haben ergeben, daß die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien vom 3. Tag nach der Verdünnung an im Magermilch-Glycerin-Verdünner besser als in der Spermasol-N-Verdünnung erhalten bleibt. Die äußerste Lebensdauer der Spermien ist im Magermilch-Glycerin-Verdünner im Vergleich zur Spermasol-N-Konservierung ebenfalls verlängert. Weiterhin zeigt es sich, daß auch der pH-Wert in der Magermilch-Glycerin-Verdünnung langsamer als bei der Verwendung von Spermasol-N abfällt. Die Temperatur bei der Zugabe des glycerinhaltigen Anteiles B des Magermilch-Glycerin-Verdünners scheint keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Spermien in vitro zu haben. Die Beweglichkeitsraten stimmen in den bei +4°C und +25 bis +27°C verdünnten Spermaproben mehr oder weniger überein. Es ergibt sich somit, daß der arbeitstechnisch wesentlich einfachere Zusatz des glycerinhaltigen Verdünneranteiles B bei einer Temperatur von +25 bis +27°C erfolgen kann, ohne daß dadurch die Konservierungsergebnisse beeinträchtigt werden.

Im Gegensatz zu den in der Tabelle Nr. VII wiedergegebenen Ergebnissen konnte im Routinebetrieb vielfach beobachtet werden, daß ein Teil der Ejakulate, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, bis zu 2 Tagen nach der Verdünnung weniger vorwärtsbewegliche Spermien enthielt, als Samen, der mit Spermasol-N verdünnt wurde. Einzelne Ejakulate unterliegen offensichtlich in der Milch-Glycerin-Verdünnung unmittelbar nach dem Verdünnen einer mehr oder weniger deutlichen Lähmung der Vorwärtsbewegung. Diese Erscheinung ist aber nur vorübergehend, dauert vielfach nur wenige Minuten, selten 1 bis 2 Tage an und scheint - wie bei der Auswertung der Befruchtungsergebnisse festgestellt werden konnte - keinen Einfluß auf die Befruchtungsfähigkeit des Samens auszuüben.

Auch bei den Routineuntersuchungen im Zusammenhang mit dem täglichen Besamungsbetrieb konnte am 3. und 4. Tag eindeutig ein starker Abfall der Beweglichkeit des mit Spermasol verdünnten Samens beobachtet werden. Dabei sinkt der pH-Wert auf 6,4. Bei dem mit Magermilch-Glycerin verdünntem Samen setzt der Abfall der Beweglichkeit später ein und geht langsamer vor sich. Erst mit Absinken des pH-Wertes unter 6,5 läßt auch hier die Vorwärtsbeweglichkeit nach. Dabei kommt es zu haufenförmigen, regellosen Verklebungen der Spermien, die sich aber durch Schütteln lösen lassen.

Aufgrund der Beobachtung, daß bei Verunreinigung der Ejakulate bei der Aufbereitung des Samens der pH-Wert und die Beweglichkeit der Spermien in der Verdünnung rasch abfallen, ist ein möglichst keimfreies Arbeiten erforderlich. In Schönböken wird versucht, diesem Ziel durch Bestrahlung des Labors mit UV-Licht bei der Bearbeitung des Verdünners nahezukommen.

III. Ergebnisse der Besamungsversuche.

1. Gesamtbefruchtungsergebnisse.

Die praktischen Erfahrungen zeigen immer wieder, daß in-vitro-Versuche zur Prüfung der Eignung von Spermaverdünnern allein nicht ausreichend sind, wenn man die Brauchbarkeit eines Verdünnungsverfahrens beweisen will. Nur die mit umfangreichem Vergleichsmaterial durchgeführte Samenübertragung und die Auswertung der Befruchtungsergebnisse erlauben, endgültige Schlußfolgerungen zu ziehen.

Zu diesem Zweck wurde vom 7. bis zum 28. Januar 1960 eine vergleichende Prüfung von Samen, verdünnt mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin, durchgeführt. Der Samen aller Bullen der Zentralbesamungsstation Schönböken wurde wochenweise wechselnd mit beiden Puffern verarbeitet. Eine Ejakulatsteilung konnte aus arbeitstechnischen Gründen nicht vorgenommen werden. An einem Stichtag, der 3 Wochen nach der letzten und 7 Wochen nach der ersten Erstbesamung des Vergleichszeitraumes liegt, wurden die Umrinderer ausgezählt. Unter den in diesem Versuch besamten Tieren, wurde keine Auslese getroffen. Die Erstbesamungsergebnisse dieser Versuche sind in der folgenden Übersicht aufgeführt:

Verdünner	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrinderer	Umrinderer %
1. Spermasol-N	6016	2110	35,1
2. Magermilch-Glycerin	2730	670	24,5
Gesamtbesamungen:	8746	2780	31,5

Tabelle Nr. VIII: 21-Tage-return-Ergebnisse aller Erstbesamungen mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin verdünntem Samen.

Die Übersicht zeigt, daß mit Hilfe der Magermilch-Glycerin-Verdünnung eine um 10,6 % bessere Erstbefruchtungsquote als bei Anwendung von Spermasol-N erzielt werden konnte.

Die hohe Zahl der mit Spermasol-N verdünntem Samen inseminierten Kühe ist auf gelegentlich auftretende, technische Schwierigkeiten bei der Herstellung des Magermilch-Glycerin-Verdünners zurückzuführen. Hinzu kommt, daß gleichzeitig ein zweiter Versuch mit einem CO_2-Verdünner dem geschilderten Vergleich parallel lief, auf dessen Ergebnisse in vorliegender Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll. Um festzustellen, ob das im Versuchszeitraum mit Magermilch-Glycerin verdünntem Samen erzielte Gesamtbefruchtungsergebnis auf eventuelle, von Tag zu Tag variierende günstige bzw. ungünstige Zufälligkeiten der Spermaqualitäten zurückzuführen ist, wurden für jeden Tag vom 7.1. bis 28.1.1960 alle unter Einsatz von Magermilch-Glycerin-Verdünner durchgeführten Erstbesamungen ermittelt und die entsprechenden return-Raten errechnet. Die in folgender Tabelle aufgeführten Tageswerte werden ohne Berücksichtigung des Samenalters oder einzelner Bullen genannt. Am 12.1. und 13.1.1960 wurden aus technischen Gründen keine Besamungen mit Samen, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, ausgeführt.

Datum	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrinderer	Umrinderer %
7.1.	115	30	26,1
8.1.	148	38	25,7
9.1.	86	23	26,8
10.1.	28	6	21,5
11.1.	20	7	35,0
12.1.	e n t f ä l l t		
13.1.	e n t f ä l l t		
14.1.	65	16	24,1
15.1.	132	38	28,8
16.1.	190	50	26,3
17.1.	133	39	29,3
18.1.	192	54	28,1
19.1.	142	37	26,0
20.1.	193	51	26,4
21.1.	177	41	23,2
22.1.	169	33	19,5
23.1.	99	15	15,2
24.1.	85	17	20,0
25.1.	96	20	20,9
26.1.	194	47	24,2
27.1.	237	54	22,8
28.1.	229	54	23,6

Tabelle Nr. IX: 21-Tage-return-Ergebnisse der Erstbesamungen unter Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner an den Tagen vom 7.1. bis 28.1.1960.

Das in Tabelle Nr. VIII für Magermilch-Glycerinsamen angegebene return-Ergebnis von 24,5 % setzt sich, wie aus Tabelle Nr. IX hervorgeht, aus 20 Tagesergebnissen zusammen. Die Schwankungsbreite der Befruchtungsquoten wird von den Werten am 11.1. mit einer return-Rate von 35,0 % und

am 23.1. mit einer return-Rate von 15,2 % begrenzt. Hierbei bleibt aber zu berücksichtigen, daß sich der genannte Wert vom 11.1.aus der kleinsten Besamungszahl (20 Tiere) herleitet.

Wenn nur die Tagesergebnisse betrachtet werden, an denen mindestens 100 Erstbesamungen mit Samen, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, pro Tag durchgeführt wurden, so liegen die Extreme einmal am 17.1. - an diesem Tage wurden 133 Kühe mit einem return-Ergebnis von 29,3 % besamt - und zum anderen am 22.1.. An diesem Tage wurden 169 Erstbesamungen ausgeführt. Der Befruchtungsmißerfolg lag bei 19,5 %. Die rund 10 % nicht übersteigende, gleichmäßig gestreute Schwankung der täglichen return-Raten lassen sich, abgesehen von anderen geringfügigen Zufällen, vermutlich durch den unterschiedlichen Samenanfall und die dadurch bedingte unterschiedliche Verwendungsdauer des verdünnten Samens erklären.

	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrinderer	Umrinderer %
1. Spermasol-N	10 235	4 103	40,1
2. Magermilch-Glycerin	2 730	670	24,5
3. CO_2-Verdünner nach JAHNEL	1 876	556	29,6
Gesamtbesamungen:	14 841	5329	35,9

Tabelle Nr. X: Erstbesamungsergebnisse aller mit Spermasol-N, Magermilch-Glycerin und CO_2-Puffer verdünntem Samen besamten Tiere, ermittelt anhand der 21-Tage-return-Ergebnisse.

Bei dieser Aufstellung ist, im Gegensatz zu der vorangegangenen Tabelle Nr. VIII, in der nur die Zeit vom 7.1. bis zum 28.1.1960 berücksichtigt worden ist, der ganze

Besamungsmonat Januar zugrunde gelegt worden. Da in der Zeit vom 28.1.1959 bis zum 7.1.1960 ausschließlich mit Sperma, verdünnt mit Spermasol-N, besamt wurde, ist auch dieZahl der mit dieser Spermaverdünnung besamten Tiere wesentlich erhöht. Das Ergebnis von 40,1 % Befruchtungsmißerfolgen spricht auch hier eindeutig gegen die Verwendung von Spermasol-N in hoher Verdünnung. Die Verdünnung des Spermas mit dem CO_2-Puffer nach JAHNEL (1959) bringt bessere Ergebnisse, die aber nicht an die mit Magermilch-Glycerin-Verdünner erzielten Ergebnisse heranreichen.Die Herstellung des CO_2-Verdünners verlangt einen großen technischen Aufwand und sehr gut geschultes Personal. Da sich die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners mit weniger Schwierigkeiten durchführen läßt und die Ergebnisse obendrein günstiger sind, wurden die Versuche mit dem CO_2-Verdünner nicht fortgesetzt. Auf nähere Einzelheiten soll hier, da an anderer Stelle schon (MÄCKLE u. TILLACK, 1960) hierüber berichtet worden ist, nicht eingegangen werden.

2. Befruchtungsergebnisse von 39 Bullen.

Es ergibt sich die Fragestellung, ob die in den Tabellen Nr. VIII und X im Vergleich zu der Spermasol-N-Verdünnung verzeichneten Verbesserungen der Besamungsergebnisse durch die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners auf eine maximale Steigerung der Befruchtungsquoten einzelner Spitzenbullen zurückzuführen ist, oder ob die Befruchtungspotenz der Ejakulate aller Bullen gleichmäßig angehoben wird. Zur Analyse dieser Frage sind in der folgenden Tabelle die Einzelergebnisse der 39 vom 7.1. bis 28.1.1960 im Einsatz gewesenen Bullen aufgeführt. Die Häufigkeit der Inanspruchnahme der Ejakulate einzelner Bullen zur Besamung war sehr ungleichmäßig. Eine Auswahl in dieser Hinsicht wurde nicht vorgenommen. Die Unterschiede der Besamungszahlen pro Bulle beruhten in

erster Linie auf der regionalen Einteilung des Einsatzes der Bullen und auf der durch die Menge und Dichte der gewonnenen Ejakulate bedingten Grenze der Verdünnung. Kleine Ejakulate mit geringer Dichte ermöglichten daher bei verschiedenen Bullen nur die Herstellung von relativ wenigen Besamungsdosen.

Bulle Nr.	Gesamtergebnis Zahl d. Erstbes.	Umrind. Zahl	%	Spermasol-N Zahl d. Erstbes.	Umrind. Zahl	%	Magermilch-Glycerin Zahl d. Erstbes.	Umrind. Zahl	%
1	407	149	36,6	274	102	37,2	133	47	35,3
2	382	110	28,8	183	55	30,1	199	55	27,6
3	366	91	24,9	219	59	26,9	147	32	21,8
4	362	111	30,7	314	101	32,2	48	10	20,8
5	357	110	30,8	301	95	31,6	56	15	26,8
6	353	142	40,2	324	134	41,4	29	8	27,6
7	353	146	41,4	338	142	42,0	15	4	26,7
8	341	100	29,3	179	60	33,5	162	40	24,7
9	327	89	27,2	271	81	29,9	56	8	14,3
10	327	110	33,6	226	85	37,6	101	25	24,8
11	307	107	34,9	307	107	34,9	-	-	-
12	280	76	23,9	138	39	28,3	142	28	19,7
13	275	123	44,7	224	109	48,7	51	14	27,5
14	271	105	38,7	254	100	39,4	17	5	29,4
15	269	88	32,7	225	72	32,0	44	16	36,6
16	257	86	33,5	241	82	34,0	16	4	25,0
17	256	63	24,6	104	35	33,7	152	28	18,4
18	251	95	36,8	241	91	37,8	10	4	40,0
19	240	82	34,2	142	58	40,5	98	24	24,5
20	224	73	32,6	123	46	37,4	101	27	26,7
21	224	77	34,4	166	59	35,5	58	18	31,0
22	216	52	24,1	100	24	24,0	116	28	24,1
23	199	76	38,1	148	62	41,9	51	14	27,5
24	198	59	29,8	79	25	31,6	119	34	28,6
25	194	60	30,9	63	18	28,6	131	42	32,1
26	177	41	26,0	24	8	33,3	153	33	21,6
27	170	52	30,6	65	31	47,7	105	21	20,0
28	169	55	52,5	148	51	34,5	21	4	19,0
29	158	39	24,7	122	31	25,4	36	8	22,2
30	142	41	28,9	100	32	32,0	42	9	21,4
31	135	32	23,7	37	21	56,3	98	11	11,2
32	122	32	26,2	75	18	24,0	47	14	38,3
33	109	27	24,8	85	22	25,9	24	5	20,8
34	83	23	27,7	50	18	36,0	33	5	15,2
35	68	17	25,0	21	6	28,6	47	11	23,4
36	47	14	29,8	33	12	36,4	14	2	14,3
37	46	12	26,1	10	2	20,0	36	10	27,8
38	44	13	29,5	22	6	27,3	22	7	31,8
39	40	11	27,5	40	11	27,5	-	-	-

Bei 30 von den 37 aufgeführten vergleichbaren Bullen ist eine Verbesserung der Befruchtungsergebnisse zu erkennen, sobald der Milch-Glycerin-Verdünner verwendet wurde. In folgender Tabelle wird eine Aufstellung der Einzelergebnisse und des Gesamtergebnisses der 7 Bullen gegeben, deren Befruchtungsergebnisse durch die Anwendung der Magermilch-Glycerin-Verdünnung nicht verbessert wurden.

Bulle	Spermasol-N-Verdünnung			Magermilch-Glycerin-Verdünnung		
	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrind.	%	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrind.	%
22	100	24	24,0	116	28	24,1
18	241	91	37,8	10	4	40,0
25	63	18	28,6	131	42	32,1
38	22	6	27,3	22	7	31,8
15	225	72	32,0	44	16	36,6
37	10	2	20,0	36	10	27,8
32	75	18	24,0	47	14	38,3
Gesamtergebnis:	736	231	31,4	406	121	29,8

Tabelle Nr. XII: Erstbesamungsergebnisse von 7 Bullen, bei denen durch die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners eine Verschlechterung der Befruchtungsraten eingetreten war.

Von den 7 angeführten Bullen lagen nur beim Bullen 22 Besamungszahlen vor, die einen sicheren Vergleich der Befruchtungskraft des Samens, verdünnt mit Spermasol-N, und des Samens, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, zulassen. Der Abfall der Befruchtungsquote betrug bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners zur Samenverdünnung bei diesen Bullen 0,1 %. Bei den anderen Bullen liegen entweder die Zahlen der Gesamtbesamungen so niedrig oder

die Verteilung bei Anwendung der beiden Verdünner ist so ungleichmäßig, daß die Einzelergebnisse für die Beurteilung der Brauchbarkeit der beiden Verdünner nicht beweisend sein können.

Zur Klärung der Frage, welchem der beiden Verdünner aufgrund der in Tabelle Nr. XII enthaltenen Erstbesamungsergebnisse der Vorrang für eine Samenkonservierung zu geben ist, kann es infolge der ungleichen Verteilung der Häufigkeit des Einsatzes der verschieden verdünnten Ejakulate nur kommen, wenn die jeweilig mit den beiden Verdünnern erzielten Gesamtergebnisse aller 7 Bullen miteinander verglichen werden.

Obwohl alle 7 Bullen bei Anwendung des Spermasol-N-Verdünners bessere individuelle Befruchtungsquoten zeigen, spricht doch das Gesamtergebnis, wenn auch nur mit einer Differenz von 1,5 %, zugunsten des Magermilch-Glycerin-Verdünners.

Bei 2 Bullen (Bulle 11 und Bulle 39, Tabelle XI) fehlt ein Vergleich der beiden Verdünner. In einem Fall handelt es sich um einen Bullen, der gerade seine Probezeit begonnen hatte. Aus diesem Grunde konnte nur mit Spermasol-N verdünnt werden, da ja über den Magermilch-Glycerin-Verdünner noch keine praktischen Erfahrungen vorlagen. Der andere Bulle konnte aus Krankheitsgründen nicht eingesetzt werden.

Im Folgenden sei der Aufstellung der Bullen, deren individuelle Besamungsergebnisse durch den Milch-Glycerin-Verdünner nicht verbesert wurden (Tabelle XII), eine Zusammenstellung der Bullen gegenübergestellt, bei denen durch die Anwendung des Milch-Glycerin-Verdünners die non-return-Raten verbessert wurden.

Bulle Nr.	Spermasol-N-Verdünnung			Magermilch-Glycerin-Verdünnung		
	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%
1	274	102	37,2	133	47	35,3
2	183	55	30,1	199	55	27,6
3	219	59	26,9	147	32	21,8
4	314	101	32,2	48	10	20,8
5	301	95	31,6	56	15	26,8
6	324	134	41,4	29	8	27,6
7	338	142	42,0	15	4	26,7
8	179	60	33,5	162	40	24,7
9	271	81	29,9	56	8	14,3
10	226	85	37,6	101	25	24,8
12	138	39	28,3	142	28	19,7
13	224	109	48,7	51	14	27,5
14	254	100	39,4	17	5	29,4
16	241	82	34,0	16	4	25,0
17	104	35	33,7	152	28	18,4
19	142	58	40,5	98	24	24,5
20	123	46	37,4	101	27	26,7
21	166	59	35,5	58	18	31,0
23	148	62	41,9	51	14	27,5
24	79	25	31,6	119	34	28,6
26	24	8	33,3	153	33	21,6
27	65	31	47,7	105	21	20,0
28	148	51	34,5	21	4	19,0
29	122	31	25,4	36	8	22,2
30	100	32	32,0	42	9	21,4
31	37	21	56,3	98	11	11,2
33	85	22	25,9	24	5	20,8
34	50	18	36,0	33	5	15,2
35	21	6	28,6	47	11	23,4
36	33	12	36,4	14	2	14,3
Gesamt-ergebnis:	4933	1761	35,7	2324	549	23,6

Tabelle Nr. XIII: Erstbesamungsergebnisse der Bullen, deren in Magermilch-Glycerin verdünnter Samen die Befruchtungsquoten verbesserte.

Durch die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners lag der Gesamt-Befruchtungshundertsatz der 30 Bullen, bei denen individuelle Verbesserungen der Befruchtungsquoten zu verzeichnen waren, mit einer return-Rate von 23,6 % gegenüber einer Umrindererquote von 35,7 %, die bei Verwendung des Spermasol-N-Verdünners erzielt wurde, um 12,1 % günstiger. Um diese Durchschnittswerte gruppieren sich die einzelnen Bullen mit mehr oder weniger großen Abweichungen in der Befruchtungspotenz.

In der folgenden Übersicht sollen die Bullen 31 und 1 aufgeführt werden, bei denen die stärkste beziehungsweise die geringste Verbesserung der Befruchtungsergebnisse durch die Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners zu beobachten war.

Bulle	Spermasol-N-Verdünnung			Magermilch-Glycerin-Verdünnung		
	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrind.	%	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrind.	%
31	37	21	56,3	98	11	11,2
1	274	102	37,2	133	47	35,3

Tabelle Nr. XIV: Maximale und minimale Verbesserung der Befruchtungsergebnisse bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners, dargestellt an den Erstbesamungsergebnissen der Bullen 31 und 1.

Die Differenzen der return-Raten betrugen 45,1 % beim Bullen 31 und 1,9 % beim Bullen 1. Der Aussagewert des Vergleiches der Ergebnisse des Bullen 31 ist jedoch gering, da nur in 37 Fällen mit Spermasol-N verdünnter Samen übertragen wurde. Die unwiderlegbare Beantwortung der Frage, ob sich die Magermilch-Glycerin-Verdünnung bei allen Bullen in gleichem Maße verbessernd auf die Befruchtungskraft aller Ejakulate auswirkt, ist in Anbetracht der zahlenmäßig unterschiedlichen Einsätze der Bullen schwierig.

Es scheint kein Zweifel darüber zu bestehen, daß die Ejakulate einzelner Bullen bei Zusatz von Magermilch-Glycerin-Verdünner unterschiedlich reagieren. Es soll daher bei nachfolgender Betrachtung eine Trennung der im Einsatz gewesenen Bullen in zwei Gruppen vorgenommen werden. Die eine Gruppe umfaßt alle die Bullen, deren Erstbesamungsergebnis bei Verwendung von Spermasol-N unter dem Gesamtdurchschnitt (35,1 % Umrinderer) der mit Spermasol-N-Konservierungen erzielten Befruchtungsergebnisse aller untersuchten Bullen liegen. In der zweiten Gruppe sind die Bullen zusammengefaßt, deren Erstbesamungsergebnisse bei Verwendung des gleichen Verdünners über dem Gesamtdurchschnitt der mit Spermasol-N erzielten Befruchtungsergebnisse liegen.

Bulle	Spermasol-N-Verdünnung			Magermilch-Glycerin-Verdünnung		
	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%
31	37	21	56,3	98	11	11,2
13	224	109	48,7	51	14	27,5
27	65	31	47,7	105	21	20,0
7	338	142	42,0	15	4	26,7
23	148	62	41,9	51	14	27,5
6	324	134	41,4	29	8	27,6
19	142	58	40,5	98	24	24,5
14	254	100	39,4	17	5	29,4
18	241	91	37,8	10	4	40,0
10	226	85	37,6	101	25	24,8
20	123	46	37,4	101	27	26,7
1	274	102	37,2	133	47	35,3
36	33	12	36,4	14	2	14,3
34	50	18	36,0	33	5	15,2
21	166	59	35,5	58	18	31,0
Gesamtergebnis:	2645	1070	40,5	914	229	25,1

Tabelle Nr. XV: Vergleich der return-Raten von 15 Bullen, deren Befruchtungsquoten bei Anwendung des Spermasol-N-Verdünners über dem Mittelwert (35,1 %) der mit Spermasol-N-Verdünnungen erzielten return-Raten lagen, mit den bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners erzielten return-Raten.

Die durchschnittliche return-Rate der in dieser Gruppe zusammengefaßten 15 Bullen betrug unter Anwendung der Spermasol-N-Verdünnung 40,5 %. Durch den Einsatz des Magermilch-Glycerin-Verdünners verringerte sich die return-Rate dieser Bullen im Durchschnitt um 15,4 % auf 25,1 %.

Bulle	Spermasol-N-Verdünnung			Magermilch-Glycerin-Verdünnung		
	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%
11	307	107	34,9	-	-	-
28	148	51	34,5	21	4	19,0
16	241	82	43,0	16	4	25,0
17	104	35	33,7	152	28	18,0
8	179	60	33,5	162	40	24,7
26	24	8	33,3	153	33	21,6
4	314	101	32,2	48	10	20,8
15	225	72	32,0	44	16	36,6
30	100	32	32,0	42	9	21,4
24	79	25	31,6	119	34	28,6
5	301	95	31,6	56	15	26,8
2	183	55	30,1	199	55	27,6
9	271	81	29,9	56	8	14,3
25	63	18	28,6	131	22	32,1
35	21	6	28,6	47	11	23,4
12	138	39	28,3	142	28	19,7
39	40	11	27,5	-	-	-
38	22	6	27,3	22	7	31,8
3	219	59	26,9	147	32	21,8
33	85	22	25,9	24	5	20,8
29	122	31	25,4	36	8	22,2
32	75	18	24,0	47	14	38,3
22	100	24	24,0	116	28	24,1
37	10	2	20,0	36	10	27,8
Gesamt-ergebnis:	3371	1040	30,9	1816	441	24,3

Tabelle Nr. XVI: Vergleich der return-Raten von 24 Bullen, deren Befruchtungsergebnisse bei Anwendung des Spermasol-N-Verdünners unter dem Mittelwert (35,1 %) der mit Spermasol-N-Verdünnungen erzielten return-Raten lagen, mit den bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners erzielten return-Raten.

Bei der zweiten Bullengruppe war die Verbesserung der Befruchtungsergebnisse durch die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners wesentlich geringer. Mit Spermasol-N verdünnter Samen erbrachte eine durchschnittliche return-Rate von 30,9 % gegenüber einer solchen von 24,3 % bei Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners. Die Differenz zwischen beiden Verdünnern beträgt also nur 7,6 %.

Aufgrund der Analyse der in den Tabellen XV und XVI verzeichneten Ergebnisse muß die Frage, ob die Befruchtungskraft der Ejakulate einzelner Bullen durch die Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners unterschiedlich beeinflußt wird, voll bejaht werden. Die Befruchtungskraft des in der Spermasol-N-Verdünnung schlecht befruchtenden Spermas der Bullen der Gruppe I wird durch die Magermilch-Glycerin-Verdünnung wesentlich stärker verbessert, als die Befruchtungskraft des in der Spermasol-N-Verdünnung besser befruchtenden Spermas der Bullengruppe II. Während in der Gruppe I die Verbesserung der durchschnittlichen Befruchtungsquoten von 15 Bullen bei 15,4 % lag, wurde in der Gruppe II (24 Bullen) lediglich eine Verbesserung der durchschnittlichen return-Raten um 7,6 % erzielt.

Die aus den bisherigen Betrachtungen gezogenen Schlußfolgerungen weisen eindeutig auf den die Befruchtungsergebnisse verbessernden Effekt des Magermilch-Glycerin-Verdünners hin. In Anbetracht des zahlenmäßig sehr ungleichen Einsatzes der zu vergleichenden Spermaverdünnungen zur Besamung könnte der Einwand erhoben werden, daß die mit der Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners verknüpften Verbesserungen der return-Raten nicht auf die gute Eignung des Magermilch-Glycerin-Verdünners zurückzuführen seien, sondern auf Zufälligkeiten der ungleichen statistischen Basis. Um diese Faktoren zumindest für einen Teil der Bullen soweit wie möglich auszuschalten, empfiehlt es sich abschließend, die Erstbesamungsergebnisse der Bullen nochmals gegenüberzustellen, deren Ejakulate in beiden Verdünnern in je mindestens 100 Fällen zur Besamung verwendet wurden.

Bulle	Spermasol-N-Verdünnung			Magermilch-Glycerin-Verdünnung		
	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%
10	226	85	37,6	101	25	24,8
20	123	46	37,4	101	27	26,7
1	274	102	37,2	133	47	35,3
17	104	35	33,7	152	28	18,4
8	179	60	33,5	162	40	24,7
2	183	55	30,1	199	55	27,6
12	138	39	28,3	142	28	19,7
2	219	59	26,9	147	32	21,8
22	100	24	24,0	116	28	24,1
9 Bullen	1546	505	32,7	1253	310	24,7

Tabelle Nr. XVII: return-Raten von 9 Bullen bei Anwendung Spermasol-N- und Magermilch-Glycerin-Verdünner.

Auch bei dieser Gegenüberstellung erweist sich die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners dem Spermasol-N-Verdünner überlegen, die return-Rate liegt um 8 % niedriger. Im Vergleich zu den durchschnittlichen Erstbesamungsergebnissen aller Bullen (Tabelle Nr. VIII) ist die Verbesserung des Befruchtungsergebnisses, errechnet aus den return-Raten dieser 9 Bullen, jedoch um 2,6 % geringer. Verbesserungen der Befruchtungsquoten um 10,6 % (Tabelle VIII) oder 8 % (Tabelle XVII) durch die Anwendung eines einfachen Verdünnungsverfahrens sind beachtliche Fortschritte, die für die Praxis der Samenübertragung von großer Bedeutung sind.

3. Verdünnungsgrad und Befruchtungsergebnisse.

Zur Untersuchung der Zusammenhänge von Verdünnungsgrad und Befruchtungsergebnissen empfiehlt es sich, zunächst

einmal die in den Monaten Januar bis Mai der Jahre 1957 - 1959 und der Monate Januar und Februar 1960 unter Verwendung des Verdünners Spermasol-N erzielten Erstbesamungsergebnisse aller im Einsatz gewesenen Bullen zu betrachten.

		Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrinderer Zahl	%	Dichte in 1000/cmm
Januar	1957	10 263	2 759	26,9	183
Februar	1957	5 231	1 368	26,2	195
März	1957	4 040	1 017	25,2	195
April	1957	3 403	875	25,7	219
Mai	1957	6 042	1 694	28,0	205
		28 979	7 713	26,6	199
Januar	1958	12 559	3 576	28,5	201
Februar	1958	6 301	1 825	29,0	238
März	1958	4 706	1 259	26,8	240
April	1958	4 444	1 034	23,3	258
Mai	1958	5 411	1 557	28,8	242
		33 421	9 251	27,7	236
Januar	1959	14 093	4 304	30,5	207
Februar	1959	6 948	1 974	28,4	216
März	1959	5 381	1 489	27,7	238
April	1959	3 601	1 009	28,1	262
Mai	1959	7 416	2 354	31,7	237
		37 439	11 130	29,7	231
Januar	1960	10 235	4 103	40,1	140
Februar	1960	1 575	700	44,4	122
		11 810	4 803	40,7	131

Tabelle Nr. XVIII: return-Raten und Spermiendichten in den Besamungsdosen bei Verwendung von Spermasol-N-Verdünner während der ersten Monate der Jahre 1957 bis 1960.

Bulle:	29.12.1958 bis 28.1.1959 Spermasol-N						7.1.1960 bis 28.1.1960 Spermasol-N						7.1.1960 bis 28.1.1960 Magermilch-Glycerin					
	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	Umrinderer %	Verdünnungsgrad ø	Verdünnungsgrad Extremwerte	Spermiendichte in der Besamungsdosis in 1000/cmm ø / Extremwerte	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	Umrinderer %	Verdünnungsgrad ø	Verdünnungsgrad Extremwerte	Spermiendichte in der Besamungsdosis in 1000/cmm ø / Extremwerte	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	Umrinderer %	Verdünnungsgrad ø	Verdünnungsgrad Extremwerte	Spermiendichte in der Besamungsdosis in 1000/cmm ø / Extremwerte
1	324	102	31,5	1: 5,3	1:3,0 - 1: 7,5	196 / 140 - 247	274	102	37,2	1: 8,7	1: 5,7 - 1:11,8	119 / 100 - 145	133	47	35,3	1: 8,9	1: 6,7 - 1:10,6	109 / 105 - 113
2	316	87	27,5	1: 7,5	1:4,4 - 1: 9,0	175 / 122 - 190	183	55	30,1	1:12,4	1:10,9 - 1:13,3	98 / 86 - 105	199	55	27,6	1:14,1	1:13,3 - 1:14,6	102 / 96 - 112
3	515	136	26,3	1: 5,6	1:2,1 - 1: 8,3	185 / 118 - 250	219	59	26,9	1:11,4	1:10,0 - 1:12,9	91 / 82 - 101	147	32	21,8	1:11,9	1:11,4 - 1:12,3	101 / 98 - 100
4	326	92	28,2	1: 6,3	1:5,0 - 1: 9,0	236 / 165 - 288	314	101	32,2	1:11,0	1: 8,8 - 1:15,0	102 / 80 - 125	48	10	20,8	1:11,3	1:11,3 - -	116 / 116 - -
5	453	123	27,2	1: 7,9	1:4,4 - 1:10,9	207 / 155 - 301	301	95	30,6	1:12,6	1: 9,3 - 1:16,0	116 / 77 - 140	56	15	26,8	1:12,1	1:12,1 - -	98 / 98 - -
6	496	166	33,5	1: 5,9	1:2,5 - 1:12,0	239 / 91 - 400	324	134	41,4	1:13,8	1:11,1 - 1:18,8	99 / 90 - 118	29	8	27,5	1:12,5	1:12,5 - -	96 / 96 - -
7	634	247	38,9	1: 4,6	1:2,2 - 1:10,0	237 / 140 - 374	338	142	42,0	1:10,6	1: 9,2 - 1:12,9	107 / 80 - 130	15	4	26,7	1:10,6	1:10,6 - -	94 / 94 - -
8	346	115	33,2	1: 7,8	1:3,3 - 1:10,0	173 / 108 - 240	179	60	33,5	1:15,3	1:12,5 - 1:20,0	129 / 60 - 174	162	40	24,7	1:20,0	1:15,0 - 1:23,0	111 / 97 - 120
9	393	109	27,2	1: 8,3	1:5,5 - 1:10,0	200 / 179 - 222	271	81	29,9	1:12,9	1:11,7 - 1:15,5	100 / 90 - 116	56	8	14,3	1:13,3	1:13,3 - -	90 / 90 - -
10	403	110	27,3	1:10,3	1:7,5 - 1:13,8	181 / 160 - 210	226	85	37,6	1:20,0	1:15,0 - 1:25,0	120 / 96 - 155	101	25	24,8	1:16,2	1:12,0 - 1:25,0	127 / 96 - 133
12	453	129	28,5	1: 5,9	1:3,6 - 1:15,0	239 / 140 - 360	138	39	28,3	1:14,6	1:12,0 - 1:17,5	89 / 74 - 100	142	28	19,7	1:13,3	1: 8,0 - 1:17,5	116 / 100 - 125
13	486	144	29,6	1: 6,8	1:5,0 - 1: 8,3	187 / 156 - 280	224	109	48,7	1: 9,3	1: 8,2 - 1:10,9	136 / 100 - 192	51	14	27,5	1:10,0	1:10,0 - -	130 / 130 - -
14	372	86	23,1	1: 7,7	1:5,0 - 1: 9,0	196 / 165 - 233	254	100	39,3	1:12,9	1:10,0 - 1:16,7	133 / 100 - 150	17	5	29,4	1:15,0	1:15,0 - -	120 / 120 - -
15	414	129	31,2	1: 6,4	1:3,1 - 1: 7,5	212 / 161 - 358	225	72	32,0	1: 8,2	1: 6,7 - 1:11,7	154 / 114 - 200	44	16	36,4	1:10,0	1:10,0 - -	110 / 110 - -
16	267	74	27,2	1: 6,5	1:4,2 - 1: 8,3	183 / 150 - 228	241	82	34,0	1:10,7	1: 6,7 - 1:11,6	105 / 64 - 130	16	4	25,0	1: 8,9	1: 8,9 - -	135 / 135 - -
18	472	155	32,8	1: 5,1	1:2,5 - 1: 8,7	234 / 163 - 440	241	91	37,7	1: 8,0	1: 6,3 - 1:11,4	86 / 76 - 100	10	4	40,0	1: 8,6	1: 6,4 - 1:10,0	94 / 94 - -
19	497	124	24,9	1: 7,2	1:5,6 - 1:10,0	217 / 183 - 294	142	58	40,5	1:10,7	1: 8,3 - 1:12,5	126 / 108 - 144	98	24	24,4	1:12,5	1:10,7 - 1:15,0	144 / 120 - 162
20	475	165	34,7	1: 8,0	1:6,0 - 1:10,0	173 / 133 - 213	123	46	37,4	1:12,7	1:10,0 - 1:14,0	100 / 86 - 120	101	27	26,7	1:12,8	1:11,4 - 1:14,0	106 / 100 - 113
24	315	83	26,3	1: 6,7	1:3,3 - 1:10,0	259 / 180 - 385	79	25	31,6	1:10,4	1: 8,0 - 1:12,9	113 / 92 - 131	119	34	28,6	1:11,5	1: 6,0 - 1:13,3	117 / 80 - 144
26	470	187	39,8	1: 3,4	1:1,9 - 1: 6,7	278 / 143 - 375	24	8	33,3	1: 6,0	1: 6,0 - -	100 / 100 - -	153	33	21,6	1: 8,2	1: 6,3 - 1:10,8	115 / 96 - 142
30	385	108	28,1	1: 6,9	1:3,3 - 1:12,5	213 / 112 - 334	100	32	32,0	1:13,7	1:12,5 - 1:15,0	98 / 84 - 112	42	9	21,4	1: 9,4	1: 6,7 - 1:11,4	127 / 107 - 150
Gesamtzahlen und Gesamtdurchschnitt	8 814	2 671	30,3	1: 6,4		210	4 420	1 565	35,4	1:11,7		111	1 739	442	25,4	1:12,0		112

Tabelle Nr. XIX: Durchschnittliche und extreme Spermiendichten sowie Verdünnungsgrade in den Besamungsdosen und return-Raten bei Verwendung von Spermasol-N und Magermilch-Glycerin-Verdünnung.

Beim Vergleich der in den Monaten Januar der Jahre 1959 und 1960 unter Verwendung des Spermasol-N-Verdünners erzielten Erstbesamungsergebnisse tritt zu Tage, daß mit Abnahme der Spermienzahl pro cmm in der Besamungsdosis von durchschnittlich 210 000 Spermien im Januar 1959 auf 111 000 Spermien im Januar 1960 eine Zunahme der durchschnittlichen Umrindererquote von 30,0 % im Januar 1959 auf 35,8 % im Januar 1960 verknüpft ist. Die Heraufsetzung der Spermasol-N-Verdünnungsgrade im Januar 1960 wurde nicht aufgrund der vergleichenden Versuchsanordnung vorgenommen, sondern war aus betriebstechnischen Gründen notwendig.

Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß mit Ausnahme der beiden Bullen 26 und 12 eine Unterschreitung der Spermiendichte von 200 000 pro cmm in der mit Spermasol-N verdünnten Samendosis zu einer Zunahme der return-Raten führt. Der Grad des Anstiegs der return-Raten erstreckt sich nicht gleichmäßig auf die 19 Bullen, deren Ejakulate in der höheren Spermasol-N-Verdünnung schlechter befruchteten. Bei 11 Bullen betrug der Anstieg der return-Raten im Jahre 1960 weniger als 5 %, bei 8 Bullen bewegte er sich zwischen 5 % und 19,1 %. Die Verringerung der Spermien in der Besamungsdosis unter 200 000 pro cmm und das Überschreiten des zuträglichen Spermasol-N-Verdünnungsverhältnisses von 1 : 6 scheinen sich also graduell und individuell unterschiedlich auf die Befruchtungskraft der Ejakulate verschiedener Bullen auszuwirken.

Obwohl im Monat Januar 1960 in den mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samendosen mit 112 000 Spermien pro cmm annähernd gleiche durchschnittliche Dichten und Verdünnungsgrade wie in den mit Spermasol-N verdünnten Spermiendosen (111 000 Spermien pro cmm) vorhanden waren, lag die Umrinderer-Rate nach Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners um durchschnittlich 10,0 % unter dem Durchschnitt der mit Spermasol-N-Verdünnungen erzielten Erstbesamungsergebnisse.

Der Vergleich, der unter Einsatz des Magermilch-Glycerin-Verdünners im Januar 1960 erzielten Erstbesamungsergebnisse mit den im Januar 1959 unter günstigen Bedingungen des Einsatzes von Spermasol-N (durchschnittliche Spermiendichte in der Besamungsdosis 210 000 pro cmm. durchschnittlicher Verdünnungsgrad 1 : 6,4), resultiert in einer Verringerung der durchschnittlichen Umrindererquote um 4,9 %.

Die Auswertung der unter Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner erzielten Erstbesamungsergebnisse läßt noch keine Aussage über das optimale Verdünnungsverhältnis zu. Die return-Raten der Bullen (2, 8, 10, 14), deren Ejakulate hoch verdünnt wurden (1 : 14 bis 1 : 20) bewegen sich zwischen 24,7 und 29,4 %. Bei Einhaltung eines geringgradigeren Verdünnungsverhältnisses (1 : 8,2 bis 1 : 9,4) schwankten die return-Raten zwischen 21,4 und 40,0 % (Bullen 1, 16, 18, 26, 30). Es kann angenommen werden, daß die Auswirkung des Verdünnungsgrades auf das Anhalten der Befruchtungskraft der Spermien auch bei der Verwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners in erster Linie von der ursprünglichen Qualität des unverdünnten Ejakulates abhängig ist und somit individuellen und zufälligen (Samenentnahme) Einflüssen unterworfen ist. Zur Ermittlung des optimalen und auch des extrem zulässigen Verdünnungsverhältnisses sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen keine Zweifel darüber, daß der Magermilch-Glycerin-Verdünner dem Spermasol-N-Verdünner auch bei der Einstellung eines höheren Verdünnungsverhältnisses überlegen ist. Der geringe Einfluß der bei den beschriebenen Versuchen gewählten Verdünnungsgrade und Spermienkonzentrationen in den Besamungsdosen auf die unter Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner erzielten Erstbesamungsergebnisse kommt in den beiden folgenden graphischen Darstellungen

gut zum Ausdruck. Ebenso deutlich zeigt sich in diesen der Anstieg der return-Raten, wenn in der Spermasol-N-Verdünnung die Spermienkonzentration von 200 000 Spermien/cmm unterschritten und das Verdünnungsverhältnis von 1 : 6 überschritten werden.

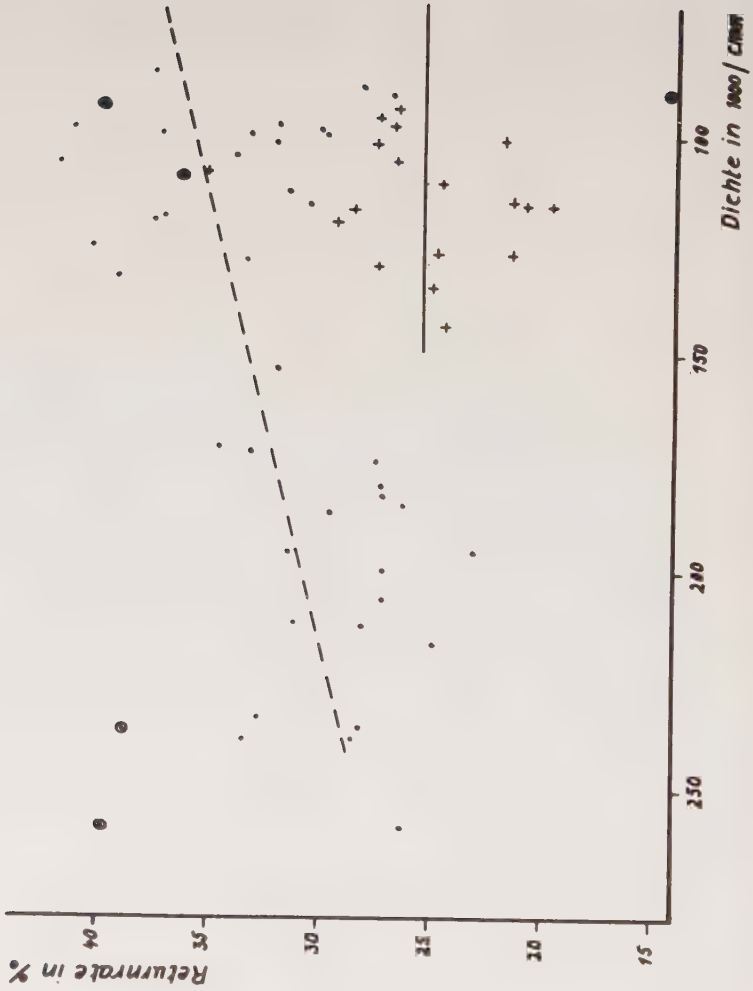

Abbildung I:

Durchschnittliche return-Raten und durchschnittliche Spermienkonzentrationen in den Besamungsdosen (21 Bullen, Jan. 1959 und Jan. 1960)
Die eingekreisten Extremwerte wurden bei der Einzeichnung der Mittelwertlinie nicht berücksichtigt.

— — — : Spermasol-N, ——— : Magermilch-Glycerin

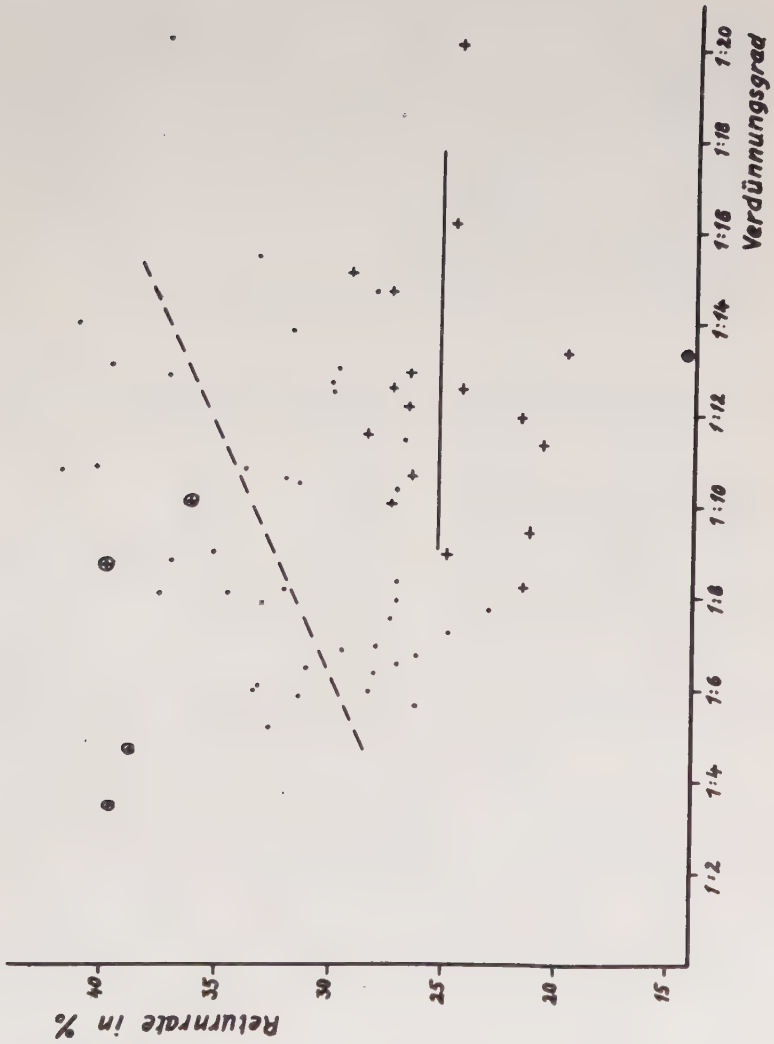

Abbildung II:

Durchschnittliche return-Raten und durchschnittliche Verdünnungsgrade (21 Bullen, Jan. 1959 und Jan. 1960). Die eingekreisten Extremwerte wurden bei der Einzeichnung der Mittelwertlinien nicht berücksichtigt.

— — — : Spermasol-N, ———— : Magermilch-Glycerin

Die bisher unter Zugrundelegung relativ kleiner Vergleichszahlen festgestellte, zu einem großen Teil auf der Unabhängigkeit vom Verdünnungsgrad beruhende Überlegenheit des Magermilch-Glycerin-Verdünners gegenüber dem Spermasol-N-Verdünner bestätigt sich auch bei der Auswertung eines größeren Vergleichsmaterials. In der folgenden Tabelle werden die im Versuchszeitraum Januar 1960 und in den folgenden Monaten (von März 1960 an kam nur noch der Magermilch-Glycerin-Verdünner zur Anwendung) registrierten Erstbesamungsergebnisse wiedergegeben.

	Zahl der Erstbes.	21-Tage-Umrinderer Zahl	%	Dichte in 1000/cmm
Januar 1960	2 730	670	24,5	117
Februar 1960	6 400	1 452	22,7	129
März 1960	6 004	1 562	26,0	140
April 1960	5 803	1 448	29,9	143
Mai 1960	7 625	2 043	26,8	136
ges.:	28 562	7 175	25,1	131

Tabelle Nr. XX: return-Raten und Spermiendichten in den Besamungsdosen bei Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner für die Monate Januar bis Mai 1960.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den in der Tabelle XVIII angeführten "Spermasol-N-Ergebnissen" zeigt es sich eindeutig, daß der Magermilch-Glycerin-Verdünner auch bei geringerer Spermienkonzentration in der Besamungsdosis (Gesamtdurchschnitt 131 000 Spermien pro cmm) in routinemäßigen Einsatz an einer großen Zahl von besamten Kühen, die im Versuchszeitraum beobachtete Verbesserung der return-Raten gewährleistet. Aus diesem, aufgrund der großen Vergleichszahlen als gesichert zu bewertenden Vergleich, ergeben sich gegenüber den Jahren 1957, 1958, 1959 sowie 1960 durch den Einsatz von Magermilch-Glycerin-Verdünner Verbesserungen der Erstbesamungsergebnisse um 1,5 %, 2,6 %, 4,6 % bzw. 15,6 %.

4. Konservierungsdauer und Befruchtungsergebnisse.

Ein Samenkonservierungsmittel soll nach den derzeitigen Forderungen geeignet sein, den Samen über einen Zeitraum von mindestens 7 bis 8 Tagen voll befruchtungsfähig zu erhalten. Durch eine weitgehende Schonung der Bullen bezüglich der Frequenz der Samenentnahme soll die Sicherung der optimalen Qualität der Ejakulate gewährleistet werden. Dies würde gleichzeitig die entscheidende Voraussetzung für die Ermöglichung der freien Bullenwahl schaffen und eine weit wirtschaftlichere Ausnutzung der Samenspender als bisher gestatten. Die Besamungsstationen brauchten sich nicht mehr mit einer vielfach zu großen Zahl von Bullen, deren Samenkapazität nur in der Hauptbesamungszeit voll genutzt werden kann, zu belasten.

In diesem Abschnitt der Ergebnisauswertung soll der Versuch gemacht werden, die Frage zu beantworten, ob der Magermilch-Glycerin-Verdünner auch in dieser Hinsicht einen Fortschritt bedeutet.

In der folgenden Übersicht werden die Erstbesamungsergebnisse aufgeführt, die beim Einsatz mit Samen, verdünnt mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin, nach 2- bis 5-tägiger Konservierung erzielt wurden. Da die Häufigkeit des Einsatzes der verschieden lang konservierten Ejakulate der einzelnen Bullen zur Anstellung individueller Vergleiche zu niedrig war, können nur die Gesamtdurchschnittsergebnisse aller Bullen, deren Ejakulate 2 bis 5 Tage konserviert wurden, ausgewertet werden.

Die Entsamung aller Bullen fand sonnabends von 10 bis 12 Uhr, an den übrigen Wochentagen von 14 bis 16 Uhr statt. Aus betriebstechnischen Gründen gelangte der verdünnte Samen immer erst am Tage nach der Entsamung zum Einsatz. In der Aufstellung ist der Tag nach der Entsamung als zweiter Tag bezeichnet.

Konservierungsdauer nach Tagen	Samen mit Spermasol-N verdünnt			Samen mit Magermilch-Glycerin verdünnt		
	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%
2.	2 713	851	31,4	1 262	309	24,5
3.	2 193	799	36,4	990	231	23,3
4.	980	408	41,6	394	107	27,2
5.	130	52	40,0	84	23	27,4
ges.:	6 016	2 110	35,1	2 730	670	24,5

Tabelle Nr. XXI: Konservierungsdauer und Erstbesamungsergebnis von Samen, mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin verdünnt, in der Zeit vom 7.1. bis 28.1.1960.

Auch aus dieser Aufstellung geht hervor, daß der Spermasol-N-Verdünner dem Magermilch-Glycerin-Verdünner auch in dieser Hinsicht eindeutig unterlegen war. Die bessere Eignung des Magermilch-Glycerin-Verdünners trat schon am 2. Tage mit einer Differenz der return-Raten von 6,9 % in Erscheinung. Am 3. Tage - d.h. am 2. Tage des Einsatzes des verdünnten Samens - lagen die return-Ergebnisse des mit Spermasol-N verdünnten Samens um 13,1 %, am 4. Tage um 14,4 % und am 5. Tage um 12,6 % schlechter als die bei Einsatz des Magermilch-Glycerin verdünnten Samens . Weiterhin ist beachtenswert, daß der Abfall der Befruchtungsquoten bei Verwendung des mit Magermilch-Glycerin konservierten Samens so langsam vor sich geht (2,9 % vom 2. bis 5..Tag), daß die Befruchtungsraten des so verdünnten Samens auch noch am 5. Tage um 4 % über den Befruchtungsergebnissen lagen, die am 2. Tage mit Spermasol-N verdünntem Samen erreicht wurden. In der Spermasol-N-Verdünnung fiel die Befruchtungskraft des Spermas zwischen 2. und 5. Tag hingegen um 8,6 %.

Für den Monat Februar 1960 liegen noch weitere Zahlen vor. In diesem Monat wurde, bis auf die ersten 6 Tage, ausschließlich Magermilch-Glycerin-Verdünner verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse wurde nach denselben Gesichtspunkten vorgenommen, die schon für den Monat Januar erläutert wurden.

Konservierungsdauer nach Tagen	Zahl der Erstbesamungen	Umrinderer Zahl	%
2.	3 021	651	21,5
3.	2 405	534	22,2
4.	840	228	27,1
5.	134	39	29,1
ges.:	6 400	1 452	22,7

Tabelle Nr. XXII: Konservierungsdauer und Erstbesamungsergebnis mit Samen, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, in der Zeit vom 7.1. bis 28.2.1960.

Der Abfall der Befruchtungskraft des mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samens hielt sich in der Zeit der Anwendung - 2. bis 5. Tage - auch hier durchaus noch in tragbaren Grenzen. Der Abfall der Befruchtungsquote betrug in diesem Zeitraum allerdings 7,6 %. Mit einer durchschnittlichen Gesamt-return-Rate von 22,7 % lag das Gesamtdurchschnittsergebnis aufgrund der ausgezeichneten Ergebnisse des 2. und 3. Tages jedoch um 1,8 % besser als im Vormonat.

Wenn die unter Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner in beiden Monaten erzielten Ergebnisse zusammengefaßt werden, ergibt sich folgende Übersicht:

Konservierungs-dauer nach Tagen	Zahl der Erstbesamungen	Umrinderer Zahl	%
2.	4 283	960	22,4
3.	3 395	765	22,6
4.	1 234	335	27,1
5.	218	62	28,4
ges.:	9 130	2 122	23,2

Tabelle Nr. XXIII: Konservierungsdauer und Erstbesamungsergebnisse mit Samen, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, in den Monaten Januar und Februar 1960.

Das Nachlassen der Befruchtungskraft zwischen dem 2. und 5. Tag der Konservierung beträgt in dieser Gesamtauswertung 6,0 %. Der intensivste Abfall ist, wie auch die Ergebnisse in den Tabelle Nr. XXI und XXII erkennen lassen, zwischen dem 3. und 4. Tag der Konservierung zu beobachten. Der geringe Anstieg der return-Raten vom 4. bis 5. Tag ist nicht überzeugend, da nur relativ wenige Besamungen mit 5 Tage aufbewahrtem Sperma ausgeführt wurden.

Bei der Analyse der Januar-Erzeugnisse fiel auf, daß die Erstbesamungsergebnisse mit Samen, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, am 3. Tage der Konservierung um 1,2 % besser lagen, als die vom 2. Tage. Da diese Erscheinung offensichtlich eine unterschiedliche Reaktion der Ejakulate der Bullen auf den Magermilch-Glycerin-Verdünner zur Ursache hatte, wurden für den Monat Februar die Tagesumrindererquoten für jeden einzelnen Bullen ausgezählt. Dabei konnte beobachtet werden, daß in den Ejakulaten von 14 Bullen am 3. Tage der Anwendung des verdünnten Samens auch ein vorübergehendes Ansteigen der Befruchtungskraft vorhanden zu sein scheint. Am 4. Tag zeichnet sich aber ein verhältnismäßig schneller Rückgang ab. Bei den restlichen im Versuch stehenden 24 Bullen dagegen ließ die Befruchtungskraft des mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samens kontinuierlich von Tag zu Tag nach.

In der folgenden Tabelle werden die durchschnittlichen Gesamtbefruchtungsergebnisse der beiden genannten Bullengruppen gegenübergestellt.

Konservierungsdauer nach Tagen	14 Bullen (Gruppe I)			24 Bullen (Gruppe II)		
Tage nach Verdünnung	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%	Zahl der Erstbes.	Umrinderer Zahl	%
2.	1 029	262	25,5	1 992	389	19,5
3.	904	183	20,2	1 501	351	23,4
4.	303	93	30,7	537	135	25,1
5.	35	11	31,4	99	28	28,3
ges.:	2 271	549	24,2	4 129	903	21,7

Tabelle Nr. XXIV: Der unterschiedliche Einfluß der Konservierungsdauer in der Magermilch-Glycerin-Verdünnung auf die Erstbesamungsergebnisse zweier Bullengruppen.

Der unterschiedliche, zum Teil von der Konservierungsdauer abhängige Einfluß des Magermilch-Glycerin-Verdünners auf die Befruchtungskraft der Ejakulate einzelner Bullen kommt beim vergleichenden Betrachten der Erstbesamungsergebnisse der beiden aufgeführten Bullengruppen deutlich zum Ausdruck.

Der verdünnte Samen der in der Gruppe I genannten 14 Bullen erreichte erst am 3. Tage seine optimale Befruchtungskraft. Dieses verzögerte Eintreten der höchsten Befruchtungspotenz des Samens am 3. Tage dürfte auf eine verlängerte Anpassungszeit der betreffenden Ejakulate an das Glycerin im Verdünner zurückzuführen sein. Diese mehr oder weniger als Glycerin-Unverträglichkeit zu deutende Erscheinung dürfte auch für den relativ steilen Anstieg der return-Raten dieser Bullengruppe vom 3. zum 4. Tage verantwortlich sein. Gegenüber der Bullengruppe II liegen hierdurch die Befruchtungsergebnisse am 4. und 5. Tag um 5,6 % bzw. 3,1 % und insgesamt um 2,5 % ungünstiger.

Wie schon an anderer Stelle angedeutet wurde, wäre es aufgrund der individuell unterschiedlichen Eignung der Ejakulate zur Glycerinierung erstrebenswert, für das Sperma eines jeden Bullen und für jedes Ejakulat vor der Verdünnung die optimale Glycerinkonzentration zu ermitteln.

Abschließend werden in Abblidung 3 die Erstbesamungsergebnisse und ihre Abhängigkeit von der Konservierungsdauer, die bei Samenverdünnungen mit Spermasol-N und Magermilch-Glycerin im Versuchszeitraum vom 7.1. bis 28.1. 1960 erreicht wurden (vgl. Tab. XXI), graphisch dargestellt. Neben den Ergebnissen der Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners für den Monat Februar (vgl. Tab. XXII) wurden auch die in den Monaten Januar und Februar mit Magermilch-Glycerin-Verdünnung erzielten durchschnittlichen Gesamtergebnisse (vgl. Tab. XXIII) mit eingetragen.

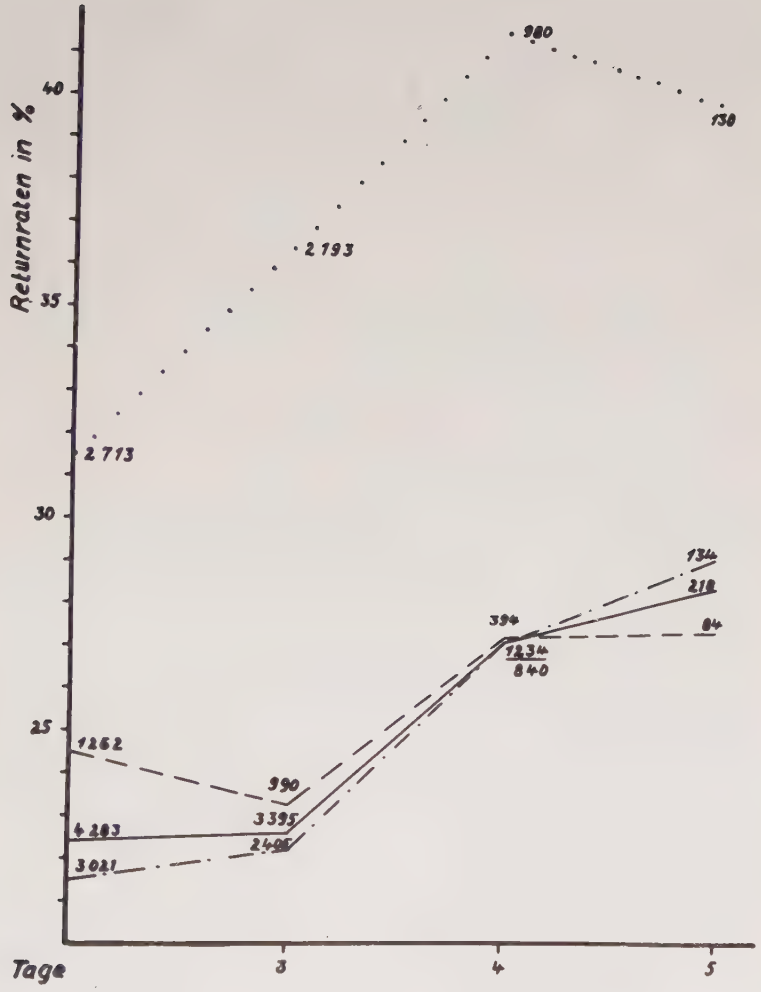

Abbildung III:
Konservierungsdauer und durchschnittliche return-Raten aller Bullen bei Verwendung von Spermasol-N und Magermilch-Glycerin-Verdünner zur Samenverdünnung.

..... : Spermasol-N-Verdünner im Monat Januar 1960
— — — : Magermilch-Glycerin-Verdünner im Monat Januar 1960
— — — : Magermilch-Glycerin-Verdünner im Monat Februar 1960
——— : Mittelwert für Magermilch-Glycerin-Verdünner in den Monaten Januar und Februar 1960.

Die Zahlen an den Kurven geben die Summen der durchgeführten Besamungen an.

Der die Befruchtungskraft der Spermien auch bei mehrtägiger Konservierung besser erhaltende Effekt des Magermilch-Glycerin-Verdünners kommt, obwohl bei einem Teil der Ejakulate Glycerin-Unverträglichkeiten zu bemerken waren, in dieser Darstellung gut zum Ausdruck. Der mit Spermasol-N verdünnte Samen zeigt mit den return-Raten von 31,4 % am 2. Tage, 36,4 % am 3. Tage und 41,6 % am 4. Tage einen schnellen kontinuierlichen Abfall der Befruchtungskraft. Der am 5. Tage beobachtete Rückgang der return-Rate auf 40,0 % kann nicht auf ein Wiederansteigen der Befruchtungskraft zurückgeführt werden, sondern dürfte auf den zu kleinen Erstbesamungszahlen beruhen. Die Eignung des Magermilch-Glycerin-Verdünners zur Samenkonservierung tritt besonders durch die Tatsache in Erscheinung, daß die in dieser Verdünnung erzielten durchschnittlichen Befruchtungsraten auch am 4. und 5. Tage noch eindeutig über denen liegen, die mit Spermasol-N-Verdünnungen am 2. Tag zu erreichen sind. Die nach 5-tägiger Konservierung im Magermilch-Glycerin-Verdünner erzielten guten Befruchtungsergebnisse haben infolge der kleinen Besamungszahlen wenig Aussagewert.

Bei der Schlußbetrachtung des Kapitels "Konservierungsdauer und Befruchtungsergebnis" erhebt sich die Frage, ob der Magermilch-Glycerin-Verdünner Voraussetzungen gibt, den verdünnten Samen über einen längeren Zeitraum als 5 Tage ausreichend befruchtungsfähig zu erhalten. Leider war es durch die hohe Beanspruchung aller vorhandenen Samendosen im Januar und Februar 1960 nicht möglich, den verdünnten Samen länger als 5 Tage einsetzen zu können. Die oben gestellte Frage muß also leider unbeantwortet bleiben. Die durchaus befriedigenden Befruchtungserfolge, die noch am 5. Tage nach der Verdünnung an einer allerdings kleinen Zahl von Fällen erzielt werden konnten, lassen aber eine Feststellung der äußersten Einsatzmöglichkeit von mit Magermilch-Glycerin verdünntem Samen erfolgversprechend erscheinen. Vielleicht läßt sich der so verdünnte Samen bei ausreichenden Befruchtungsquoten über einen Zeitraum von 7 Tagen verwenden. Damit wäre die freie Bullenwahl gewährleistet.

D. Zusammenfassende Besprechung der Versuchsergebnisse

In vorliegender Arbeit sollten der von ALMQUIST (1959) vorgeschlagene Magermilch-Glycerin-Verdünner und der Spermasol-N-Verdünner der Firma MACK, Illertissen, vergleichend in vitro und in vivo geprüft werden.

In einer Reihe von Vorversuchen sollten die Einwirkungen der einzelnen Bestandteile des Magermilch-Glycerin-Verdünners auf den verdünnten Samen studiert und Erfahrungen über den besten Verdünnungsmodus gesammelt werden. Bei den in-vitro-Versuchen wurden alle Verdünnerbestandteile einzeln und in Kombination einer Prüfung unterzogen.

Abweichend von der Vorschrift nach ALMQUIST (1959) wurde anstelle frischer Magermilch das Magermilchpulver der Dt'sch. NESTLE A.G. "Molico" als Verdünnergrundlage gewählt. "Molico" empfiehlt sich gegenüber weiteren 6 Milchpulverfabrikaten durch eine konstante Qualität und weitgehende Keimarmut.

Es ist anzunehmen, daß ein Teil der in der Literatur erwähnten Mißerfolge mit Milchverdünnern (u.a. JAQUET u. CASSOU, 1952, PETERS, 1953 und EIBL, 1959) auf ungenügende Milchqualitäten zurückzuführen sind. Milchverdünner, die Trockenmagermilch zur Grundlage haben, werden in der Literatur stets positiv gewertet (u.a. KRAWARIK, 1957, VAN DEMARK u. COUTURIER, 1958, PRACHOFF, 1958, MELROSE u. Mitarbeiter, 1958).

Ein Lösungsverhältnis von 9 Gewichtsprozenten Magermilchpulver, in diesem Fall "Molico", auf 91 ccm Aqua dest. entpricht aufgrund der dem Spermaplasma entprechenden Isotonie auch nach Ansicht von EIBL (1959) und SENEGACNIK (1960) den Anforderungen als Konservierungsmittel am besten. Wie sich in mehreren Versuchsreihen herausstellte, ist es zur Zerstörung des Lactenins notwendig, die Milch für ca. 10 Minuten auf 92 bis 93°C zu erhitzen.

Zur Auflösung des Magermilchpulvers kann wegen seiner relativen Ionenarmut nur über Glas destilliertes Wasser Verwendung finden. Durch den Einbau von 0,35 % Gelatine - für bakteriologische Zwecke gekörnt - konnte ein Sedimentieren des Samens weitgehend verhindert werden.
Der Argumentation von EIBL und Mitarbeitern (1960), die auf Spermaschädigungen durch schwankende Gelatinequalitäten hinweisen, kann nicht gefolgt werden. Auch die von den gleichen Autoren angeführte Häufung von Spermienagglutinationen war nicht zu beobachten. Ein Ersatz der Gelatine durch Eidotter in dem von EIBL und Mitarbeitern (1960) beschriebenen Sinne kann nicht ohne weiteres vorgenommen werden. Es erscheint notwendig, weiterhin erst zu prüfen, inwieweit die Eizugabe den Magermilch-Glycerin-Verdünner negativ oder postiv beeinflussen kann. Über die Eizugabe zum glycerinfreien Magermilch-Verdünner sind an anderer Stelle gute Erfahrungen gemacht worden (WEISS, 1952, PETERS, 1953).

Als Glycerinzusatz zum Magermilch-Verdünner ist reinstes, wasserfreies Glycerin in möglichst dünnflüssiger Konsistenz zu empfehlen. Es ist anzuraten, stets Originalabfüllungen zu verwenden, da bei diesen eine weitgehende Reinheit des Glycerins vorausgesetzt werden kann. Von entscheidender Bedeutung ist eine optimale Glycerinkonzentration in der Spermaverdünnung. In Versuchsreihen mit 5-, 6-, 10-, 12- und 15-prozentigen Glycerinzusätzen, die an jeweils geteilten Ejakulaten durchgeführt wurden, konnten bei einer Konzentration von 8 % Glycerin die günstigsten Überlebungsraten der Spermien ermittelt werden. Die Zugabe des glycerinhaltigen Verdünners B zu dem mit glycerinfreiem Verdünner A vorverdünnten Sperma hat am besten in 4 steigenden Fraktionen in je 10-minütigen Abständen zu erfolgen. Der gesamte Verdünnungsvorgang mit Magermilch-Glycerin kann unbedenklich bei Zimmertemperatur geschehen. Dadurch kann gegenüber dem von ALMQUIST vorgeschlagenen Verdünnungsmodus - Zugabe des glycerinhaltigen Verdünneranteils bei +4°C - eine wesentliche Arbeitserleichterung geschaffen werden.

Aufgrund der Erfahrungen aus den Vorversuchen empfiehlt sich folgende Verdünnerzusammensetzung:

In 100 ccm über Quarzglas destilliertem Wasser werden 0,35 % Gelatine, für bakteriologische Zwecke gekörnt, gelöst. Nach erfolgter Erhitzung - für einige Minuten auf ca. 95°C - und Abkühlung werden pro 91 ccm Gelatinewasser 9 g " Molico" zugegeben. Diese Milchaufschwemmung muß dann im Wasserbad für 10 Minuten auf 92 bis 93°C erwärmt werden. Als antibiotischer Schutz wird, nachdem die Milch wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt ist, die "Antibiotika-Schere" der Firma MACK, Illertissen, in der üblichen Konzentration zugesetzt. Der Glycerinanteil des Magermilch-Glycerin-Verdünners beträgt in der Endkonzentration 8 Volumenprozent. Der verdünnte Samen wird in Einportionsgläschen abgefüllt und im Kühlschrank bei einer Temperatur von +2 bis +3°C in Schwammgummikissen aufbewahrt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung zeigte ein Teil der mit Magermilch-Glycerin verdünnten Ejakulate vorübergehend weniger vorwärtsbewegliche Spermien, als mit Spermasol-N verdünnter Samen. Einzelne Ejakulate unterlagen unmittelbar nach der Verdünnung mit Magermilch-Glycerin einer mehr oder weniger deutlichen Lähmung der Vorwärtsbewegung. Diese Lähmung der Spermien war aber vorübergehend und dauerte meist nur einige Minuten. Ein Einfluß dieser Erscheinung auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermien konnte nicht festgestellt werden. In dem mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samen nimmt die Prozentzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien langsamer ab, als bei Verwendung des Spermasol-N-Verdünners. Die äußerste Lebensdauer der Spermien hält in der Magermilch-Glycerin-Verdünnung ebenfalls länger an.

In Besamungsversuchen wurden zu Vergleichszwecken 6016 Erstbesamungen mit Samen, verdünnt mit Spermasol-N, und 2730 mit Samen, verdünnt mit Magermilch-Glycerin, ausge-

führt. Eine Auswahl der weiblichen Tiere wurde nicht getroffen. Die Verdünnungsgrade waren bei beiden Verdünnern so eingestellt, daß mindestens 90 000 bis 100 000 Spermien pro cmm Besamungsdosis enthalten waren. Je nach Größe und Dichte der Ejakulate und Bedarf an Besamungsdosen lag ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 6 bis 1 : 20 vor.

Die Auswertung der Befruchtungsergebnisse geschah unter Zugrundelegung der 21-Tage-return-Raten nach folgenden Gesichtspunkten:

1. Gesamtbefruchtungsergebnisse.
2. Individuelle Befruchtungsergebnisse von 39 Bullen.
3. Verdünnungsgrad und Befruchtungsergebnisse.
4. Konservierungsdauer und Befruchtungsergebnisse.

1. Gesamtbefruchtungsergebnisse.

Die durchschnittlichen Befruchtungsergebnisse aller Bullen betrugen bei Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner 75,5 % und lagen gegenüber den mit Spermasol-N-Verdünnungen erzielten Ergebnissen (64,9 %) um 10,6 % günstiger.

2. Befruchtungsergebnisse von 39 Bullen.

Zur Klärung der Frage, ob sich die durch die Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners erzielte Verbesserung der Befruchtungsquoten gleichmäßig auf die Ergebnisse aller Bullen verteilt, wurden die Umrindererraten aller im Versuch stehender 39 Bullen im Einzelnen errechnet. Bis auf 7 Bullen konnte bei allen anderen Bullen eine individuelle Steigerung der Befruchtungspotenz des Samens festgestellt werden, sobald der Magermilch-Glycerin-Verdünner zum Einsatz gelangte. Das durchschnittliche Gesamtbefruchtungsergebnis der 7 Bullen, deren Einzelergebnisse nicht verbessert wurden, lag aber, da die Erstbesamungszahlen sehr stark variierten, immer noch um 1,6 % über dem durchschnittlichen Gesamtergebnis dieser Bullengruppe mit dem mit Spermasol-N verdünnten Samen. Die Feststellung von

HOLT (1953), daß durch die Zugabe von 10 % Glycerin zu einem Eidotter-Zitrat-Verdünner schlecht befruchtender Samen zwar verbessert, die Qualität relativ gut befruchtenden Samens aber nicht geändert wird, kann für den Magermilch-Glycerin-Verdünner nur teilweise bestätigt werden.

Während die schlechten Befruchter (15 Bullen) bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners eine Verbesserung der Befruchtungsergebnisse gegenüber den Ergebnissen der Spermasol-N-Verdünnung um 15,4 % erkennen ließen, war auch bei den guten Befruchtern (24 Bullen) in der Mehrzahl bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners eine Zunahme der Erstbefruchtungsquote festzustellen. Sie betrug im Durchschnitt bei dieser Bullengruppe 7,6 %. Es trat also, insgesamt betrachtet, abgesehen von den erwähnten 7 Bullen, bei 32 Bullen eine Verbesserung der Befruchtungsraten ein, sobald deren Ejakulate in Magermilch-Glycerin-Verdünner konserviert wurden.

3. Verdünnungsgrad und Befruchtungsergebnis.

Die Befruchtungskraft des mit Spermasol-N verdünnten Samens läßt bei Überschreiten der von der Firma MACK, Illertissen, gegebenen Verdünnungsleitzahlen von 1 : 2 bis 1 : 6 erheblich nach. Die unter Verwendung des Spermasol-N-Verdünners erzielten Erstbesamungskonzeptionsraten gingen bei einer durchschnittlichen Spermienzahl von 111 000 pro cmm Besamungsdosis - dies entspricht einem Verdünnungsgrad von 1 : 6 bis 1 : 20 (der Durchschnitt lag bei 1 : 11,7) - gegenüber dem Ergebnis des Vorjahres, in dem pro cmm Besamungsdosis bei einem durchschnittlichen Verdünnungsgrad von 1 : 6,4 durchschnittlich 210 000 Spermien vorhanden waren, um 5,1 % von 69,7 auf 64,6 % zurück. Obwohl in den mit Magermilch-Glycerin-verdünnten Samendosen mit 112 000 Spermien pro cmm eine annähernd gleiche Dichte wie in der Spermasol-N-Verdünnung vorhanden war, lag das durchschnittliche Gesamtbefruchtungsergebnis

der vergleichbaren 21 Bullen um 10,0 % über dem Durchschnitt der mit Spermasol-N erzielten Befruchtungsraten der gleichen Bullengruppe. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Verdünnungsgrad bei Verwendung von Magermilch-Glycerin-Verdünner höher gewählt werden kann, ohne daß hierdurch, wie bei der Verwendung des Spermasol-N-Verdünners, die Befruchtungsergebnisse nachteilig beeinflußt werden.

4. Konservierungsdauer und Befruchtungsergebnisse.

Die Befruchtungspotenz (ausgedrückt in return-Raten) der mit Magermilch-Glycerin verdünnten Ejakualte ließ in der Zeit der Anwendung des verdünnten Samens vom 2. bis 5. Tage der Konservierung lediglich um 2,9 % (24,5 % zu 27,4 %) nach und war am 5. Tage noch um 4 % besser, als die mit Spermasol-N verdünnten Samen am 2. Tage der Konservierung (31,4 %). In der Spermasol-N-Verdünnung fiel die Befruchtungspotenz des Samens vom 2. bis 4. Tage von 31,4 % auf 41,6 % um 10,2 % rasch ab. Die Spermien verschiedener Bullen (14 von 38) reagierten auf die Einwirkung des Glycerins im Magermilch-Glycerin-Verdünner unterschiedlich. Ein Teil ihrer mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samendosen erreichten ihre optimale Befruchtungskraft vermutlich infolge einer Glycerin-Unverträglichkeit erst am 3. Konservierungstage. Am 2. Tag,dem jeweils ersten Tag des Einsatzes des verdünnten Samens, lagen die durchschnittlichen Umrindererraten dieser Bullen mit 25,5 % um 5,3 % höher als am 3. Tage (20,2 %). An den beiden folgenden Tagen (4. und 5. Tag) fiel dann die Befruchtungsquote schneller ab, als bei der vergleichbaren Bullengruppe (24 Bullen), in deren Ejakulaten ein langsames , aber kontinuierliches Nachlassen der Befruchtungskraft vom 2. bis 5. Tage beobachtet wurde. In der zuletzt genannten Bullengruppe war das durchschnittliche Gesamtbefruchtungsergebnis vom 2. bis 5. Tage (return-Rate 21,7 %) auch um 2,5 % günstiger.

Aufgrund der individuell unterschiedlichen Eignung der Ejakulate zur Glycerinierung wäre es erstrebenswert, für jedes Ejakulat eines jeden Bullen die optimale Glycerinkonzentration vor der Verdünnung des Spermas zu bestimmen.

Von Bedeutung scheint auch die durch den Glycerinzusatz bewirkte Gefrierpunkterniedrigung (bei 10 % 2,8°C, DE GROOT, 1956) insofern zu sein, daß durch die Verringerung der Gefriergefahr bei der Kühlschrankaufbewahrung die Kühlung des mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samens auf +2° bis +3°C ermöglicht wird, die sich im Vergleich zur Aufbewahrung bei +5°C günstig auf die Herabsetzung des Spermasstoffwechsels auswirkt.

Die heute bekannten Samentransportsysteme funktionieren nur unter sehr schwer zu erfüllenden Bedingungen exakt. Die Temperatur sinkt leicht unter +5°C. Dadurch kann es in den Samenverdünnungen mit Spermasol- N zu Spermaschädigungen kommen, die bei Anwendung des Magermilch-Glycerin-Verdünners wegen des erniedrigten Gefrierpunktes nicht beobachtet werden konnten. Da der mit Magermilch-Glycerin verdünnte Samen gegen nicht allzu starke Temperaturabfälle unter +5°C weitgehend unempfindlich ist, konnten einige Außenstellen, deren Besamungserfolge aufgrund mangelhafter Pflege des mit Spermasol-N verdünnten Samens stets unter dem Stationsdurchschnitt lagen, durch den Einsatz des Magermilch-Glycerin-Verdünners eine Verbesserung der Befruchtungsquoten erreichen.

Mit dem beschriebenen Magermilch-Glycerin-Verdünner konnten auch die von ALMQUIST (1959) bei 1- bis 4-tägiger Konservierung an Färsen erreichten Erstbesamungskonzeptionsraten von 73 % mit 75,5 % um 2,5 % übertroffen werden.

Die Befruchtungsergebnisse des Besamungsversuches berechtigen zu der Schlußfolgerung, daß der Magermilch-Glycerin-Verdünner bei Anwendung des verdünnten Samens bis 1 : 20 dem Spermasol-N-Verdünner deutlich überlegen ist.

In weiteren Versuchen ist zu klären, ob durch Ausdehnung der Anwendung des verdünnten Samens bis zum 7. Tag der Magermilch-Glycerin-Verdünner geeignet ist, die freie Bullenwahl zu ermöglichen.

E. Zusammenfassung.

Es wurde ein auf den Angaben von ALMQUIST (1959) basierender, modifizierter Magermilch-Glycerin-Verdünner vergleichend mit dem Spermasol-N-Verdünner der Fa. MACK, Illertissen, in vitro und in vivo geprüft.

Nach einer kurzen Übersicht der in der Literatur enthaltenen Hinweise zu den Fragen der Verdünnerherstellung auf der Grundlage des Natrium-Zitrates und der Milch wurden Vorversuche über die geeignete Zusammensetzung eines Trockenmagermilch-Glycerin-Verdünners und über den zweckmäßigsten Verdünnungsmodus unternommen.

Eine Reihe von Verdünnerbestandteilen wurden in Reagenzglasversuchen anhand des Anhaltens der Vorwärtsbeweglichkeit und der äußersten Lebensdauer der Spermien in den Verdünnungen geprüft. Es empfiehlt sich folgende Verdünnerzusammensetzung:

9 Gewichtsprozente "Molico" in 91 ccm über Quarzglas destilliertem Wasser lösen. Durch einen 0,35 %igen (g/V) Gelatinezusatz - Gelatine für bakteriologische Zwecke gekörnt - zum Verdünner wird ein Sedimentieren der Spermien in den Besamungsdosen weitgehend verhindert. Zur Beseitigung des spermafeindlichen Lactenins und zum Zwecke einer den Bedürfnissen entsprechenden Sterilisierung muß dieses Milch-Gelatine-Gemisch für ca. 10 Minuten in einem Wasserbad auf 92 - 93°C erhitzt werden. Als Glycerinzusatz zum Milch-Glycerin-Verdünner empfiehlt sich doppelt destilliertes Glycerin D_{20} 1,221 - 1,231 DAB_6 der Fa. RIEDEL DE HAEN A.G. in einer Endkonzentration von 8 Volumenprozent. Als keimhemmender Faktor wird die "Antibiotika-Schere" der Fa. MACK, Illertissen, nach den bekannten Richtlinien hinzugefügt.

Der Magermilch-Verdünner wird halbiert in einen glycerinfreien Teil A und einen glycerinhaltigen Teil B (16 Volumenprozent Glycerin; 8 Volumenprozent in der Endverdünnung bedingend). Der glycerinfreie Verdünneranteil A wird dem Samen zügig zugesetzt. Die Endverdünnung mit dem glycerinhaltigen Anteil B des Verdünners hat in vier steigenden Fraktionen in je 10-minütigen Abständen zu erfolgen.

Abweichend von dem von ALMQUIST (1959) empfohlenen Verdünnungsmodus (Vorverdünnung bei Zimmertemperatur, Endverdünnung bei einer Kühlschranktemperatur von +4°C) kann sowohl die Vor- als auch die Endverdünnung bei Zimmertemperatur erfolgen.

Bei vergleichenden in-vitro-Versuchen zwischen diesem Verdünner und dem Spermasol-N-Verdünner war der Magermilch-Glycerin-Verdünner hinsichtlich der Überlebensrate der Spermien in den Besamungsdosen dem Spermasol-N-Verdünner überlegen.

In einem praktischen Versuch mit 8 746 Erstbesamungen (6 016 Spermasol-N, 2 730 Magermilch-Glycerin) konnte festgestellt werden, daß bei Überschreitung einer Endverdünnung von 1 : 6 der Verdünner Spermasol-N wenig geeignet erscheint, während Ejakulate in Magermilch-Glycerin verdünnt auch bei Verdünnungsgraden von 1 : 6 bis 1 : 20 gute Befruchtungsergebnisse liefern.

Die Differenz der nach dem 21-Tage-non-return-Verfahren ermittelten Erstbefruchtungsraten zwischen beiden Verdünnern betrug 10,6 % (Spermasol-N = 64,9 %; Magermilch-Glycerin = 75,5 %).

Die Überlegenheit des Magermilch-Glycerin-Verdünners wird besonders deutlich, wenn ein Einsatz des verdünnten Samens über einen Zeitraum von 4 bis 5 Tagen verlangt wird. Während die Erstbesamungserfolge bei 5-tägiger Nutzung der mit Spermasol-N verdünnten Samendosen vom 2. bis 5. Tage der Konservierung von 68,6 % auf 60,0 % sanken, ließ die Befruchtungskraft des mit Magermilch-Glycerin verdünnten Samens unter den gleichen Voraussetzungen lediglich von 75,5 % auf 72,6 % nach.

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. HEIDRICH, für die Auswahl des Themas und die zahlreichen Anregungen meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Herrn Dr. HUHN, Oberassistent der hiesigen Klinik, bin ich für die jederzeit freundlich gewährte Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse zu besonderem Dank verpflichtet.

Gleichfalls gilt Herrn Dr. MÄCKLE, Leiter der Lehr- und Versuchsstation, Schönböken, für die stets wohlwollende Förderung mein herzlicher Dank.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgemeinschaft Schleswig-Holsteinischer Rinderbesamungsvereinigungen e.V. und dem Zentralbesamungsverein, Schönböken, für die materielle Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils der Arbeit.

Literaturquellen

1. ADLER,H.C. u. N.O. RASBECH (1956): Untersuchungen über den Gebrauch von Magermilch und Sahne als Spermaverdünnungsflüssigkeit.
Nord. Vet. med. 8, 497

2. AEHNELT,E. (1951): Vergleichende experimentelle Prüfung der Spermaverdünner Eidotter-Spermasol, Eidotter-Zitrat und Sp.V. 161
Dtsch. tierärztl.Wschr. 58, Beil.Fortpfl. u. Bes. d. Haustiere 1, 34

3. ALBRIGHT,J.L., EHLERS,M.H. u. R.E.ERB (1958): Spermatozoa surivival in milk diluent with and without seminal plasma.
J. Diary Sci. 41, 1110

4. ALMQUIST,J.O. (1954): Diluters for bovine semen. V. A comparision of heated milk and egg yolk-citrate as diluters for semen from bulls of high and low fetility.
J. Dairy Sci. 37, 1308

5. ALMQUIST,J.O. (1959): Efficient, low cost results using milk-glycerol diluent.
A.I. Digest 7, H.8.

6. ALMQUIST,J.O., FLIPSE,R.J. und D.L.THACKER (1954): Diluters for bovine semen. IV Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim-milk.
J..Dairy Sci. 37, 1303

7. AMANN,R.P. und J.O. ALMQUIST (1957): Freezing of bovine semen. II. Effect of milk solids levels, glycerol level, and fructose on freezability of bull speratozoa in reconstitutes and fresh skim-milk diluents.
J. Dairy Sci. 40, 1542

8. BAIER,W., LEIDL,W., MAHRLA,A. u. M.SCHRÖDL (1955): Möglichkeiten der Bekämpfung der Pseudomoniasis genitalis bei Besamungsbullen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 62, Beil-Fortpfl. u. Bes. d. Haust., 1, 1

9. BONADONNA,T.: zitiert bei EIBL (1959)

10. BONADONNA,T. (956): Einige biologische und nicht biologische Faktoren, welche die Ernte und Qualität des Samenmaterials beeinflussen können.
Zootecn. e Vet. 11, 297 (ital.)
Ref. Die Veterinärmedizin 11, 84 (1958)

11. BONFERT,A. (1953): Beitrag zur Beurteilung verschiedener Verdünner für Rindersperma.
Tierärztl. Umschau 8, 414

12. BONFERT,A., BONFERT,M. u. U. REUSS (1955): Über die Wirkung einer Antibiotikaschere auf das Bact. pyocyaneum im Bullensperma.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 61, Beil. Fortpfl. u. Bes. d..Haust. 5, 57

13. DEMARK, VAN N.L. u. L.R.COUTURIER (1958): Flow dialysis as a means of preserving bovine semen at room Temperature.
J. Dairy Sci. 41, 530

14. DEMINATUS,F. (1956): Die Tiefkühlung des Bullenspermas.
Vet. med. Diss. Hannover

15. DESELAERS,H. (1959): Vergleichende Untersuchungen über die Beeinflussung der Bewegungsaktivität und Haltbarkeit von Bullensperma nach Verdünnung mit verschiedenen Handelsmilchsorten.
Vet. med. Diss. Hannover

16. DREHER,W.H. u. J.H.WEBB (1953): A comparison of homogenized whole milk and egg - yolk-phosphate as diluters for bull semen.
J. Dairy Sci. 36, 673

17. EIBL,K. (1959): Lehrbuch der Rinderbesamung
Verl. Parey, Berlin-Hamburg

18. EIBL,K., ZODER,H.F. u. R.HAHN (1960): Über Versuche, die Sedimentierung der Spermien im Verdünner zu unterbinden (Vorläufige Mitteilung)
Dtsch. tierärztl. Wschr. 67, 233

19. FLERCHINGER,F.H., ERB,R.E. u. M. EHLERS (1953): The use of heated homogenized milk as a diluter for bull semen.
J. Dairy Sci. 36, 1016

20. FLIPSE,R.J., PATHON,ST. u. J.O. ALMQUIST (1954): Diluters for bovine semen. III. Effect of lactenin and of lactoperoxidase upon spermatozoan livability.
J. Dairy Sci. 37, 1205

21. GÖTZE,R. (1949): Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.
Verl. Schaper, Hannover

22. GÖTZE,R., AEHNELT,E. u. G.RATH (1953): Anweisungen zur Gewinnung, Verdünnung, Aufbewahrung und zum Transport des Bullenspermas.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 60, Beil.Fortpfl. u. Bes. d. Haust. 3, 33

23. GROOT,B. de (1956): Die Physiologie des Tiefgefrierens beim Bullensamen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 63, Beil. Fortpfl. u. Bes. d. Haust. 6, 25

24. GSTIRNER (1959): Persönliche Mitteilung.

25. HOELZER, H. (1951): Erfahrungen mit dem Verdünner "Spermasol".
Dtsch. tierärztl. Wschr. 58, Beil. Fortpfl. u. Bes. d. Haustiere 1, 36

26. HOFFMANN,L.: zitiert bei DESELAERS (1959)

27. HOLT,A.F. (1953): The effect of glycerolisation of bull semen on fertility.
Vet. Rec. 65, 624 u. 679

28. JAQUET,J. u. R. CASSOU (1952): Nouvelles recherches sur un milieu à bàse de lait écrémé en vûe de la conservation du sperme des taureaux.
Elevage et Insémination, H. 11, 1, Ref. Dtsch. tierärztl. Wschr. 60, Beil. Fortpfl. u. Bes. d. Haust. 3, 16 (1953)

29. JOEL, CH.A.: Studien am menschlichen Sperma.
Verl. Schwabe, Basel (1953)

30. JOYNER,L.P. (1954): The elimination of trichomonas foetus from infected semen by storage in the presence of glycerol.
Vet. Rec. 66, 727

31. Kleine Mitteilungen (Anonym): Künstliche Besamung.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 65, 57 (1952)

32. KONSTANTINOW,P. (1955): Anwendung der Kuhmilch als Spermaverdünner bei künstlicher Besamung von Schafen und Kühen im Bezirk von Tirnowo (bulgar.)
Zivotnodstvo i veterinarno delo (Sofia) 8, 37
Ref. Landw. Zbl. Abt. III, 1, 896 (1955/56)

33. KRAUSE II, D. (1961): Derzeitiger Stand der Verfahren zur Konservierung von Bullensperma.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 68, 115

34. KRAWARIK,F. (1957): Eidotterzitrat-Spermasol- und Trockenmilchverdünner.
Wien. tierärztl. Mschr. 44, 719

35. KÜST,D. u. F.SCHAETZ (1954): Die Besamung beim Rind.
Verl. Enke, Stuttgart

36. LA GRANGE (1959): Persönliche Mitteilung.

37. LEUTHARDT,F. (1959): Lehrbuch der physiologischen Chemie. Verl. de Gruyter, Berlin

38. MÄCKLE,N. u. J.TILLACK (1960): Vergleichende Versuche mit drei Spermaverdünnern (Vorläufige Mitteilung). Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 73, 184

39. MANN,T. u. I.G.WHITE (1956): Metabolism of glycerol, sorbitol, and related compounds by spermatozoa. Natúre 178, 142
Ref. Zuchthyg. 1, 54 (1957)

40. MC LEAN,J.M. (1956): Results on the use of bovine semen stored 6-10 days in homogenized whole milk with the addition of 10 % glycerin.
N.A.A,B. News, March-April 13
Ref.Dtsch. tierärztl. Wschr. 63, Beil. Fortpfl. u. Bes. d. Haust. 7, 93

41. MELROSE,D.R., STEWART,D.L. u. W. BRUCE (1958): Comparative fertility studies of bovine semen diluents containing powdered skimmilk, fresh skimmilk, glycine and egg yolk.
Vet. Rec. 70, 433

42. MICHAILOW,N.I.: zitiert bei PRACHOFF (1958)

43. MILLER,W.J. and N.L. VAN DEMARK (1954): The influence of glycerol level, various temperature aspects and certain other factors on the survial of bull spermatozoa at sub-zero. temperature.
J. Dairy Sci. 37, 45

44. MILOWANOW,W.K.: zitiert bei EIBL (1959)

45. O'CONNOR,L.K. u. G.F.SMITH (1959): The comparative fertility of bovine semen of four ages diluted with skimmilk and skimmilk a. glycerol.
J. Agric. Sci. 53
Ref. Anim. Breed,,Abstr. 28 (1960)

46. O'DELL,W.T., FLIPSE,R.J. u. J.O. ALMQUIST (1956): Metabolism of bovine semen.
III. Uptake and metabolic utilization of glycerol -1-C^{14} by bovine spermatozoa. - J. Dairy Sci. 39, 214

47. OHMS,J.I. u. E.L. WILLET (1957): Fertility of bovine spermatozoa in diluters containing yolk-citrate or nonfat milk solids with glycerol.
J. Dairy Sci. 40, 1019
Ref. Anim. Breed, Abstr. 26, 209

48. PETERS,J. (1953): Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit des Eidottermilchverdünners.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 60, Beil. Fortpfl. u. Bes. d. Haust. 3, 14 u. 17

49. PHILLIPS: zitiert bei PETERS (1953)

50. PIKETT,B.W. (1958): The metabolism and localization of glycerol by bovine spermatozoa
Diss. Abstr. 19, 6
Ref. Anim. Breed, Abstr. 27, 788

51. POLGE,C., SMITH,A.U. u. A.S. PARKES:zitiert bei DEMINATUS (1956)

52. PRACHOFF,R. (1958): Die Milch als Pufferlösung für Sperma bei künstlicher Besamung der landwirtschaftlichen Nutztiere.
Zuchthyg. 2, 144

53. PRACHOFF u. HADJISKY : zitiert bei PRACHOFF (1958)

54. RIEDEL,M. (1958): Erfahrungen bei der Verwendung entrahmter Molkerei-Frischmilch (Magermilch) als Verdünner von Bullensperma.
Zuchthyg. 2, 140

55. RULFFES,R. (1951): Versuche zur Verdünnung des Bullenspermas.
Vet. med. Diss. Hannover

56. SAKALA,J. u. K.TURECEK (1958): Der Einfluß des Milchverdünnungsmittels auf die Fruchtbarkeit der Bullenspermien (Tschech.).
Veterinarstvi 8, 140
Ref. Landw. Zbl. Abt. IV, 4, 1476 (1959)

57. SCHRÖDER (1959): Persönliche Mitteilung

58. SCHURIAN,E. (1958): Versuche über die Verwendbarkeit einiger Verdünner bei der Tiefgefrierung von Bullensamen.
Vet. med. Diss. Hannover

59. SENEGACNIK,J. (1960): Über einige biochemische Eigenschaften der Milchverdünner für Stiersamen.
Zuchthyg. 3, 180

60. SIKES,J.D. u. C.P.MERILAN (1958): Preliminary results on the preservation of bovine semen in a milk-egg-yolk-glycerol extender.
J. Dairy Sci. 41, 205

61. SOKOLOWSKAJA,J.J., DROSBOVA,L.P., GOLSEVA,M.G., KOROTKOV,A.J., MAKSIMOV,J.L. u. W.A, LEBEDEVA (1956): Über die Vervollkommnung der synthetischen Mittel für den Stier- und Widdersamen (russ.)
Zivotnovodstvo 8, 22
Ref. Zuchthyg. 1, 53 (1957)

62. THACKER,D.L., FLIPSE,R.J. u. J.O. ALMQUIST (1954): Diluters of bovine semen. II. Effect of milk proteins upon spermatozoan livability.
J. Dairy Sci. 37,220

63. TIMM,G. (1959): Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Glycerinsorten und anderer mehrwertiger Alkohole als Verdünnerzusatz bei der Einfrierung und Tiefkühllagerung von Bullensperma.
Vet. med. Diss. Hannover

64. ULLNER,W. (1957): Untersuchungen über die bakterizide Wirkung der "Antibiotika-Schere" bei Spermaverdünnern.
Zuchthyg. 1, 36

65. WEISS,K. (1952): Spermaverdünner mit Milch.
Wien. tierärztl. Mschr. 39, 668

66. WILLETT,E.L. u. J.I.OHMS (1956): Livability of spermatozoa in diluters containing yolk-citrate or nonfat milk solids with glycerol.
J. Dairy Sci. 39, 1759

Lebenslauf

Am 11. Juli 1935 wurde ich, Johannes Tillack, als Sohn des Pfarrers Werner Tillack und seiner Ehefrau Gabriele Tillack, geb. Lenz, in Crossen/Oder geboren.

Nach dem Besuch der Grund- und Oberschule in Königs Wusterhausen wurde mir am 26. Juni 1954 das Zeugnis der Reife zuerkannt. Zum Wintersemester 1954 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin immatrikuliert.

1955 legte ich das Vorphysikum und 1956 das Physikum ab. Im Sommersemester 1958 wechselte ich zur Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität zu Berlin über, an der ich das Studium am 27. November 1959 mit dem Staatsexamen beendete. Am 16. Juni 1960 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.